

Der Effekt von VEGF aus myeloischen Zellen auf die  
Entstehung von Tumorrezidiven nach  
chemotherapeutischer Behandlung

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
**Dr. rer. nat.**

der Fakultät für Biologie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
  
Master of Science  
Ralph Sebastian Klose

aus Georgsmarienhütte

Februar 2013

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Arbeitskreis von Prof. C. Stockmann im Zeitraum von August 2010 bis Februar 2013 am Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: **Prof. C. Stockmann**

2. Gutachter: **Prof. W. Hansen**

3. Gutachter: -

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: **Prof. S. Knauer**

Tag der mündlichen Prüfung: **06-05-2013**

## Publikationen:

1. KLOSE, R., GOTTHARDT, D., PUTZ, E.M., MEINECKE, A.K., SCHRÖDTER, K., HELFRICH, I., JOHNSON, R.S., FANDREY, J., SEXL, V. & STOCKMANN, C. (2013). Targeting VEGF in myeloid cells delays tumor relapse by enhancing chemotherapy-induced tumor cell senescence and NK cell-dependent immune surveillance. (in Vorbereitung).
2. CRONA, M., AVESSON, L., SAHLIN, M., LUNDIN, L., HINAS, A., KLOSE, R., SÖDERBOM, F. & BRITT-MARIE SJÖBERG (2013). A Rare Combination of Ribonucleotide Reductases in the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*, First Published on January 31, 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.442434.
3. MEINECKE, A.K., NAGY, N., DAMICO LAGO, G., KIRMSE, S., KLOSE, R., SCHRÖDTER, K., ZIMMERMANN, A., HELFRICH, I., RUNDQVIST, H., THEEGARTEN, D., ANHENN, O., ORIAN-ROUSSEAU, V., JOHNSON, R.S., ALITALO, K., FISCHER, J.W., FANDREY, J. & STOCKMANN, C. (2012). Aberrant mural cell recruitment to lymphatic vessels and impaired lymphatic drainage in a murine model of pulmonary fibrosis. *Blood*, **119**, 5931-42.

## Kongreßbeiträge:

1. KLOSE, R. (2011). The effect of myeloid cell derived vascular endothelial growth factor on tumor relapse after anti tumor therapy. Symposium on immune recognition of pathogens and tumours, Mülheim a.d.R. (Vortrag).
2. KLOSE, R., MEINECKE, A.K., SCHRÖDTER, K., HELFRICH, I., JOHNSON, R.S. & STOCKMANN, C. (2011). The effect of myeloid cell derived vascular endothelial growth factor on tumor relapse after cytotoxic therapy. 10. Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Essen (Poster)
3. KLOSE, R., MEINECKE, A.K., SCHRÖDTER, K., HELFRICH, I., JOHNSON, R.S. & STOCKMANN, C. (2012). The effect of myeloid cell-derived Vascular Endothelial Growth Factor on tumor relapse – reshaping the tumor microenvironment during cytotoxic therapy. Keystone Symposia, Angiogenesis: Advances in Basic Science and Therapeutic Applications, Snowbird, Utah, USA (Poster).
4. KLOSE, R., MEINECKE, A.K., SCHRÖDTER, K., HELFRICH, I., JOHNSON, R.S., SEXL, V. & STOCKMANN, C. (2012). Targeting myeloid cell-derived VEGF and the tumor microenvironment to improve NK cell tumor surveillance upon cytotoxic treatment. Sensing Hypoxia in the Cell and the Organism, HypoxiaNet, Essen (Poster).

5. KLOSE, R., MEINECKE, A.K., SCHRÖDTER, K., HELFRICH, I., JOHNSON, R.S., SEXL, V. & STOCKMANN, C. (2012). Targeting myeloid cell-derived VEGF and the tumor microenvironment to improve NK cell tumor surveillance upon cytotoxic treatment. 11. Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Essen (Poster).

## **Preise:**

1. Posterpreis, 11. Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Essen (November 2012)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Blutgefäßsystem . . . . .	1
1.1.1	Struktureller Aufbau von Blutgefäßen . . . . .	1
1.1.2	Das Endothel und seine Funktionen . . . . .	2
1.1.3	Mechanismen der embryonalen Blutgefäßbildung . . . . .	2
1.1.4	Angiogenese im adulten Organismus . . . . .	4
1.2	Tumorangiogenese und Tumorphypoxie . . . . .	4
1.2.1	Struktur und Funktion von Tumorgefäßen . . . . .	5
1.2.2	Regulation und Mechanismen der Tumorangiogenese . . . . .	6
1.3	Die Wachstumsfaktoren der VEGF-Familie . . . . .	8
1.3.1	Isoformen und Funktionen von VEGF . . . . .	8
1.3.2	VEGF-Rezeptoren und Signaltransduktion . . . . .	9
1.3.3	Regulation der VEGF-Expression . . . . .	11
1.4	VEGF als therapeutisches Ziel zur Behandlung solider Tumore . . . . .	12
1.4.1	Klassische Anti-VEGF-Behandlungsansätze . . . . .	12
1.4.2	Zielgerichtete Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen . . . . .	14
1.5	Effekte der chemotherapeutischen Behandlung . . . . .	14
1.5.1	Tumorsuppression durch Apoptose und Seneszenz . . . . .	15
1.5.2	Antitumorantwort durch Immunzellen . . . . .	16
1.5.3	Tumorresistenz und Tumorrückbildung . . . . .	18
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>21</b>
3.1	Materialien . . . . .	21
3.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien . . . . .	21
3.1.2	Chemikalien . . . . .	22
3.1.3	Puffer und Lösungen . . . . .	24
3.1.4	Antikörper . . . . .	26
3.1.5	Oligonukleotide . . . . .	27
3.1.6	Kommerzielle Kits . . . . .	28
3.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	29
3.2.1	RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe . . . . .	29
3.2.2	Reverse Transkription . . . . .	29
3.2.3	Amplifizierung und Auftrennung von DNA-Fragmenten . . . . .	30
3.2.4	Aufreinigung und Konzentration von DNA . . . . .	31
3.2.5	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration . . . . .	31

3.2.6	Quantitative Realtime-PCR . . . . .	31
3.3	Biochemische Methoden . . . . .	33
3.3.1	Herstellung von Proteinlysaten . . . . .	33
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	33
3.3.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	33
3.3.4	Western Blot . . . . .	34
3.3.5	Kompetitiver Enzymgekoppelter Immunabsorptionsassay (ELISA) . . . . .	34
3.3.6	Immunhistochemie und Immunfluoreszenz . . . . .	34
3.4	Zellbiologische Methoden . . . . .	35
3.4.1	Kultivierung von Zellen . . . . .	35
3.4.2	Kryokonservierung von Zellen . . . . .	35
3.4.3	Trypanblau-Färbung und Bestimmung der Zellzahl . . . . .	35
3.4.4	Durchflusszytometrische Bestimmungen . . . . .	36
3.5	Tierexperimentelle Methoden . . . . .	36
3.5.1	Tierhaltung und -zucht . . . . .	36
3.5.2	VEGF/LysM-transgenes Mausmodell . . . . .	36
3.5.3	Genotypisierung . . . . .	37
3.5.4	Subkutane Tumordinjektion und chemotherapeutische Behandlung . . . . .	37
3.5.5	Bestimmung des Tumorwachstums . . . . .	37
3.5.6	NK-Zell-Depletion . . . . .	38
3.5.7	Gewebeentnahme und -verarbeitung . . . . .	38
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
4.1	Die Rolle von myeloid Zell-spezifischem VEGF während der Tumorrückbildung nach Chemotherapie . . . . .	39
4.1.1	Deletion von VEGF in myeloischen Zellen beeinflusst die Wachstumskinetik von Tumoren . . . . .	39
4.1.2	Die Reduktion von VEGF in myeloischen Zellen führt zu einer Normalisierung tumoraler Blutgefäße . . . . .	42
4.2	Der Einfluss von Chemotherapie auf die Tumorzellen und das Tumormikromilieu nach genetischer Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen . . . . .	46
4.2.1	Die Deletion von myeloid Zell-spezifischem VEGF hat keinen langfristigen Effekt auf Apoptose nach zytotoxischer Behandlung . . . . .	46
4.2.2	Die Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen erhöht die Chemotherapie-induzierte Seneszenz in Tumorzellen . . . . .	47
4.2.3	Prämatüre Seneszenz verstärkt die nicht-adaptive Immunantwort im Tumor nach VEGF-Deletion in myeloischen Zellen . . . . .	52

---

4.2.4	Der Verlust von VEGF in myeloischen Zellen verstärkt die NK-Zell-abhängige Immunüberwachung seneszenten Zellen . . . . .	55
4.3	Verzögertes Tumorwachstum nach Chemotherapie ist abhängig von einer Tumorzell-intrinsischen Seneszenzantwort . . . . .	59
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
5.1	Die Auswirkungen der genetischen Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen auf den Gefäßphänotyp nach Chemotherapie . . . . .	70
5.2	Der Einfluss von Chemotherapie auf die Tumorzelle in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen . . . . .	72
5.3	Der Effekt der spezifischen Deletion von VEGF in myeloischen Zellen auf das Tumormikromilieu nach chemotherapeutischer Behandlung . . . . .	75
5.4	Die Bedeutung Tumorzell-intrinsischer Seneszenz für die Tumorprogression und Rezidivbildung . . . . .	79
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>110</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	110
8.2	Abbildungsverzeichnis . . . . .	112
8.3	Tabellenverzeichnis . . . . .	114
8.4	Lebenslauf . . . . .	115
8.5	Erklärung . . . . .	116
8.6	Danksagung . . . . .	117

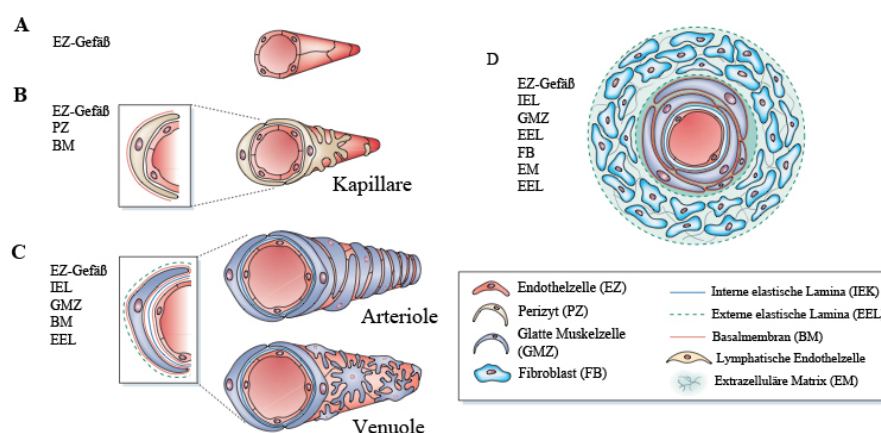
# 1 Einleitung

## 1.1 Das Blutgefäßsystem

Das Blutgefäßsystem dient der Versorgung der Zellen, Gewebe und Organe des Organismus mit lebensnotwendigem Sauerstoff, Nährstoffen und verschiedenen Botenstoffen sowie dem Abtransport von Stoffwechselendprodukten. Die vom Herzen wegführenden Gefäße werden als Arterien bezeichnet, die sich im weiteren Verlauf in kleinere Arteriolen verzweigen und schließlich die Verbindung zu den Kapillaren herstellen. Postkapillär vereinigen sich diese Gefäße zu Venuolen und Venen, welche die zum Herzen hinführenden Gefäße darstellen. Arteriolen, Kapillaren und Venuolen bilden den Bereich zwischen sauerstoffreichem und sauerstoffarmem Blut und werden als Endstrombahn bezeichnet.

### 1.1.1 Struktureller Aufbau von Blutgefäßen

Alle Blutgefäße bestehen aus mehreren Gewebsschichten (Abb. 1.1). Arterien und Venen weisen dabei einen gleichartigen dreischichtigen Grundbauplan auf, der sich jedoch in der Zusammensetzung der einzelnen Schichten unterscheidet. Die *Tunica intima* bildet die Innenschicht des Gefäßes und besteht aus flachen Endothelzellen, welche mit einer Basalmembran in Verbindung stehen. Die Mittelschicht (*Tunica media*) besteht aus glatten Muskelzellen, Kollagen und elastischen Fasern und grenzt die *Tunica intima* von der außen anliegenden *Tunica externa* ab, welche das Blutgefäß abschließt. Sie besteht aus Fibroblasten, extrazellulärer Matrix sowie einer elastischen Lamina und dient der Verankerung in der entsprechenden Umgebung (Jain, 2003). Bei den Gefäßen der Endstrombahn erfolgt der Aufbau hingegen nur aus einer Endothelschicht, der umgebenden Basalmembran sowie den außen anliegenden Perizyten.



**Abb. 1.1: Struktureller Aufbau der Blutgefäße.** A: Blutgefäß in der Entstehung; B: Kapillare; C: Arteriole und Venuole; D: Arterie und Vene. Modifiziert nach Jain (2003).

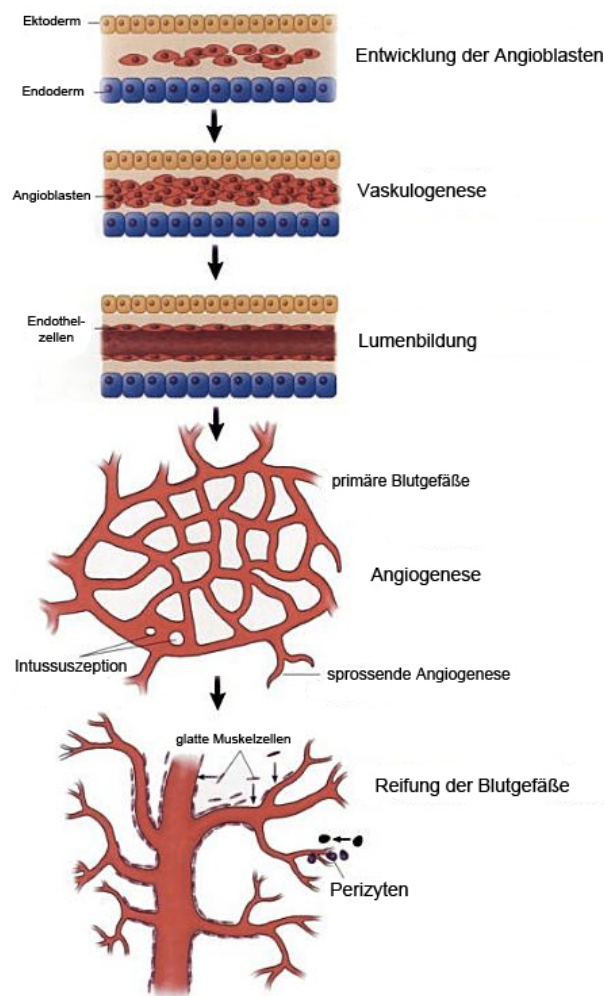
### 1.1.2 Das Endothel und seine Funktionen

Die Endothelzellen sind spezialisierte, flache Zellen, welche die Innenseite aller Blutgefäße auskleiden und somit eine physikalische Barriere zwischen Blutstrom und perivaskulärem Gewebe bilden (Ross, 1995). Neben der protektiven Funktion sind die Endothelzellen an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt. Das Endothel ermöglicht den selektiven Transport und Austausch von Makromolekülen, löslichen Faktoren und im Blut zirkulierenden Zellen (Cines *et al.*, 1998). Die Permeabilität der Blutgefäßwand wird dabei durch verschiedene Formen endothelialer Zell-Zell-Kontakte bestimmt (Dejana, 2004). Durch die Bildung und Freisetzung von Molekülen, die als Regulatoren der Blutgerinnung beteiligt sind, verhindert das Endothel die Adhäsion und Koagulation der Blutplättchen und reguliert somit den Blutfluss (Becker *et al.*, 2000). Wichtige Faktoren sind hierbei Thrombomodulin, Plasminogen, von-WillebrandFaktor (vWF) und Fibrinogen. Durch Synthese vasodilatatorischer (z.B. Stickstoffmonoxid, Prostazyklin) bzw. vasokonstriktorischer Faktoren (z.B. Endothelin, Angiotensin II) beeinflussen Endothelzellen den Tonus der Blutgefäßmuskulatur (Palmer *et al.*, 1987). Des weiteren spielen Endothelzellen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung inflammatorischer Zellen bei Entzündungen bzw. Infektionen. Hierfür sezernieren sie Zytokine, Chemoattraktoren und Wachstumsfaktoren, die zu einer Adhäsion der Immunzellen an die Endothelzellen und späteren Extravasation aus dem vaskulären System zum Ort der Entzündung führen (Hurairah & Ferro, 2004; Middleton *et al.*, 2002).

### 1.1.3 Mechanismen der embryonalen Blutgefäßbildung

Die Bildung des Blutgefäßsystems erfolgt bereits während der frühen Embryonalentwicklung und ist essentiell für die Versorgung des Embryos mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die Entstehung der Blutgefäße basiert dabei auf zwei verschiedenen Mechanismen (Abb. 1.2). Die Vaskulogenese beschreibt den Prozess der Entstehung primärer Blutgefäße aus sich *in situ* differenzierenden endothelialen Vorläuferzellen zu Endothelzellen (Risau, 1997). Dabei differenzieren sich Hämangioblasten aus den mesodermalen Zellen des Dottersacks und bilden sogenannte Blutinseln. Aus der inneren Schicht der Blutinseln entwickeln sich die hämatopoetischen Stammzellen, während die endothelialen Vorläufer aus den Zellen der Peripherie entstehen (Asahara *et al.*, 1997). Durch den Zusammenschluss der ersten sich entwickelnden primitiven Endothelzellen beginnt im weiteren Verlauf die Ausbildung eines vaskulären Netzwerkes (Risau & Flamme, 1995). Die Vaskulogenese ist nicht nur auf die Embryonalentwicklung beschränkt, sondern konnte auch im adulten Organismus unter der Beteiligung endothelialer Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Asahara *et al.*, 1999; Kalka *et al.*, 1999).

Der zweite Mechanismus der Blutgefäßentstehung wird als Angiogenese bezeichnet, bei der die primären Gefäße expandieren und verzweigen (Carmeliet, 2000; Patan, 2000). Die neuen Gefäße können dabei auf zwei verschiedene Weisen entstehen. Die sprossende Angiogenese basiert auf der Migration, Proliferation und Bildung tubulärer Strukturen. Bei der Intussuszeption wird ein größeres Blutgefäß durch das Einfügen endothelialer Schichten in mehrere kleinere Gefäße unterteilt (Bartel & Lametschwandtner, 2000; Burri, 1992; Djonov *et al.*, 2000; Patan *et al.*, 1992).



**Abb. 1.2:** Mechanismen der Blutgefäßentstehung. Modifiziert nach Harvey & Rosenthal (1999).

### 1.1.4 Angiogenese im adulten Organismus

Die physiologische Gefäßneubildung ist im adulten Organismus streng reguliert und nur auf wenige Prozesse beschränkt. Angiogene Prozesse sind dabei für das Wachstum des Muskel- und Fettgewebes relevant (Lloyd *et al.*, 2003; Rupnick *et al.*, 2002). Im weiblichen Organismus kommt es während des Reproduktionszyklus sowie der Entwicklung der Milchdrüse zu physiologischen Gefäßänderungen (Findlay, 1986; Plendl, 2000; Smith, 1998; Torry & Torry, 1997). Darüber hinaus gewährleistet Angiogenese die Blutversorgung der Plazenta während der Gravidität sowie im Rahmen regenerativer Prozesse, wie beispielsweise der Wundheilung (Findlay, 1986; Tonnesen *et al.*, 2000).

Weitere Formen der Neovaskularisation nach der Embryonalentwicklung spielen im Rahmen pathophysiologischer Prozesse eine entscheidende Rolle. Eine exzessive Angiogenese trägt zur Pathogenese zahlreicher Krankheiten bei und wurde bereits im Zusammenhang bestimmter Formen der Arthritis und Retinopathie gezeigt (Ferrara, 2000). Eine weitere Dysregulation des Gefäßwachstums ist bei Krankheitsbildern der Psoriasis, krankhaften Adipositas, Makuladegeneration, Arteriosklerose sowie bei Hämangiomen zu finden (Carmeliet, 2003; Ferrara, 2000; Heits *et al.*, 1998). Vor allem stellt die pathologische Angiogenese jedoch die Grundlage für das Wachstum sowie die spätere Metastasierung solider Tumore dar (Folkman, 1971, 1975).

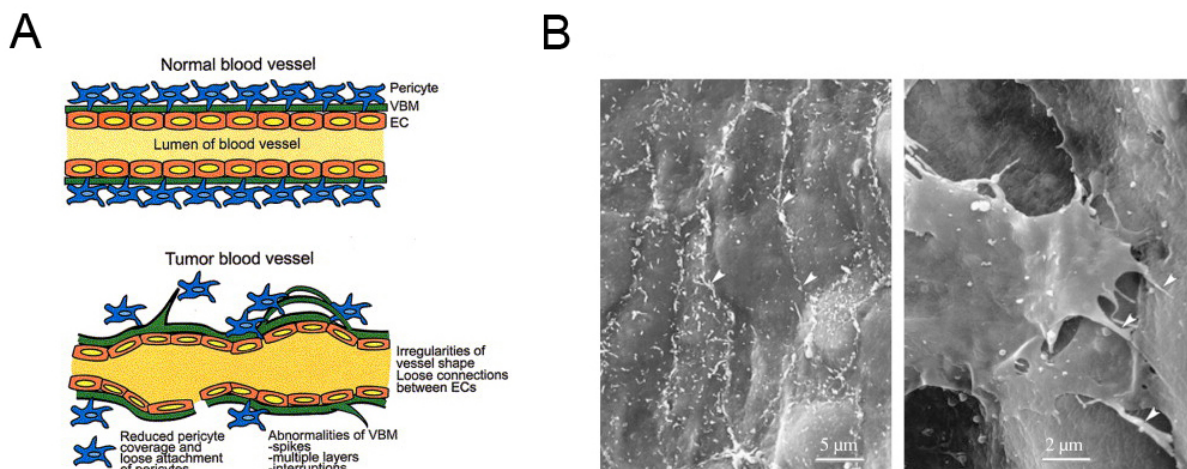
## 1.2 Tumorangiogenese und Tumorphoxie

Solide Tumore benötigen für ein schnelles Wachstum eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Bis zu einer Größe von ca. 1 - 2 mm<sup>3</sup> kann dieser Bedarf durch Diffusion aus dem umgebenden Gewebe gedeckt werden (McDougall *et al.*, 2006). Für ein weiteres Wachstum ist die Neubildung eigener Blutgefäße notwendig. Die Induktion der Tumorangiogenese ist dabei vom Tumortyp und seiner Umgebung abhängig und kann in den unterschiedlichsten Stadien der Tumorentwicklung erfolgen (Bergers & Benjamin, 2003).

Trotz der Ausbildung neuer Blutgefäße verfügen Tumore infolge ihres schnellen Wachstums nur über eine unzureichende Gefäßversorgung, die zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff führt. Diese sogenannte Tumorphoxie innerhalb maligner Tumore stellt dabei einen wichtigen Faktor bezüglich der Aggressivität und des Metastasierungspotentials dar und geht daher in vielen Fällen mit einer schlechten Prognose einher (Höckel & Vaupel, 2001; Höckel *et al.*, 1996). Ursachen hierfür liegen neben einer verstärkten Angiogenese in der Selektion Apoptose-resistenter Tumorzellen, die durch Hypoxie gefördert werden, sowie eine durch Hypoxie vermittelte genetische Instabilität maligner Zellen (Graeber *et al.*, 1996; Stoler *et al.*, 1992).

### 1.2.1 Struktur und Funktion von Tumorgefäßen

Intratumorale Blutgefäße unterliegen einem konstanten Wachstumsprozess, der die Stabilisierung und Reifung der entstandenen Gefäße verhindert. Tumorgefäße unterscheiden sich daher sowohl in ihrer Struktur als auch ihrer Funktion von physiologisch entstandenen Blutgefäßen (Abb. 1.3). Die Gefäße innerhalb eines Tumors weisen starke Verzweigungen und Dilatationen auf (McDonald & Baluk, 2002; Mollica *et al.*, 2003). Die Endothelschicht ist oft inhomogen strukturiert mit übereinander ins Lumen hineinwachsenden Endothelzellen, so dass ein Mosaik aus Endothel- und Tumorzellen mit wechselnden Durchmessern und toten Enden entsteht (Hashizume *et al.*, 2000). Unterbrechungen in der Basalmembran sowie eine geringe Anzahl von Perizyten, die mit dem Endothel assoziiert sind, sorgen für einen Stabilitätsverlust und eine höhere Permeabilität der Blutgefäße, durch die es zu einem unregelmäßigen Blutfluss innerhalb des Tumors kommt (Baluk *et al.*, 2003; Morikawa *et al.*, 2002). Die Sauerstoffversorgung kann deshalb trotz hoher Gefäßdichte unzureichend sein, was die Entstehung hypoxischer und azidotischer Bereiche innerhalb des Tumors fördert und wiederum die Angiogenese verstärkt.



**Abb. 1.3: Struktur physiologischer und tumoraler Blutgefäße** A: Schematische Darstellung nach Sund *et al.* (2005). B: Elektronenmikroskopische Aufnahmen gesunder (links) und tumoraler (rechts) Blutgefäße in murinen Milchdrüsen (Narang & Varia, 2011).



### 1.2.2 Regulation und Mechanismen der Tumorangiogenese

Die physiologische Angiogenese unterliegt im gesunden Organismus einer strengen Regulation verschiedener pro- und antioangiogener Faktoren (Tab. 1.1). Das Gleichgewicht zwischen diesen Faktoren wird durch den Bedarf an Sauerstoff und Metaboliten gesteuert (Plate *et al.*, 1994; Talks & Harris, 2000). Beim Übergang vom avaskulären zum vaskulären Tumor, dem sogenannten *angiogenic switch*, verschiebt sich dieses Gleichgewicht im Tumorgewebe zugunsten der proangiogenen Faktoren. Die Freisetzung dieser wachstumsfördernden Faktoren und die damit verbundene Induktion der Neovaskularisierung erfolgt dabei durch verschiedene Stimuli, wie z.B. die Aktivierung von onkogenen bzw. Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren, die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder Mutationen im Genom der Tumorzellen (Bergers & Benjamin, 2003; Folkman, 2003; Hanahan & Folkman, 1996).

Die Neubildung tumoraler Blutgefäße erfolgt grundsätzlich wie bei der physiologischen Angiogenese (Abb. 1.4). Durch die Sezernierung des Wachstumsfaktors VEGF (siehe Abschnitt 1.3) kommt es zu einer Vasodilatation und erhöhten Permeabilität der Wirtsgefäße, die durch die Angiopoetin-2 vermittelte Lockerung der stabilisierenden Perizyten-schicht verstärkt wird (Maisonpierre *et al.*, 1997; Senger *et al.*, 1983). Die Freisetzung von Proteasen, Matrixmetalloproteasen und anderer proteolytischer Faktoren führt zu einer Degradierung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix (Kalluri, 2003). Im weiteren Verlauf lösen die Endothelzellen ihre inter- und periendothelialen Zellkontakte auf und migrieren in Richtung des angiogenen Stimulus in den perivaskulären Raum ein. Nach der Bildung des ersten Kapillarsprosses aus Endothelzellen kommt es an dessen Spitze zur weiteren Auflösung und Umstrukturierung der extrazellulären Matrix in Richtung Tumor und schließlich zur Bildung neuer Gefäßlumina. Durch die Ausbildung einer Basalmembran sowie Rekrutierung perivaskulärer Zellen werden die Blutgefäße stabilisiert. Wichtige Faktoren für die Mobilisation dieser Zellen sind hierbei u.a. PDGF- $\beta$  und PlGF (Carmeliet *et al.*, 2001; Distler *et al.*, 2003). Nach Anschluss des Tumors an das bestehende Gefäßsystem entstehen durch rasches, expansives Wachstum hypoxische bzw. nekrotische Bereiche innerhalb des Tumors, durch die wiederum die Entstehung neuer intratumoraler Blutgefäße initiiert wird (Carmeliet, 2003).

Tab. 1.1: Übersicht wichtiger pro- und antiangiogener Faktoren.

Proangiogene Faktoren	Antiangiogene Faktoren
Angiogenin	Angiopoietin-2 (Ang-2)
Angiopoietin-1 (Ang-1)	Angiostatin
Angiotropin	Arresten
Epidermal Growth Factor (EGF)	Canstatin
Fibroblast Growth Factor (FGF)-1 und -2	Endostatin
Interleukine (IL-1, -2, -6 und -8)	Interferone ( $\alpha$ , $\gamma$ )
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	Interleukine (IL-4, -12 und -18)
Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)	Maspin
Placenta Growth Factor (PlGF)	Platelet Factor-4 (PF-4)
Platelet Derived Growth Factor (PDGF)	Thrombospondin 1-4 (TSP 1-4)
Prostaglandine (E1 und E2)	Heparin
Transforming Growth Factor (TGF) ( $\alpha$ und $\beta$ )	Troponin-1
Tumor Necrosis Factor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	Tumstatin
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Vasostatin

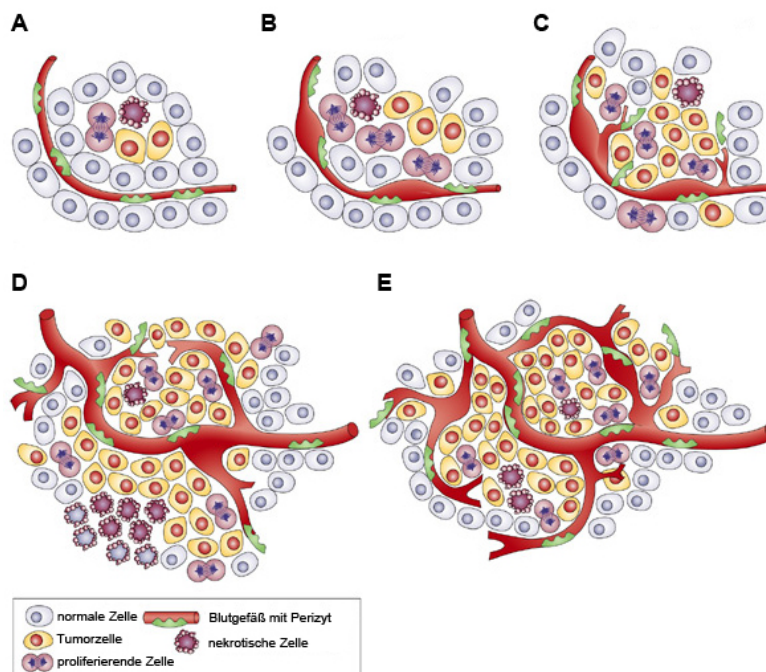
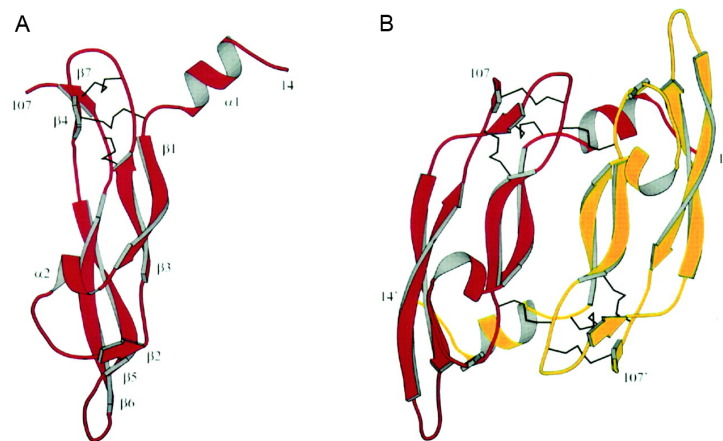


Abb. 1.4: Mechanismen der Blutgefäßentstehung im Tumor. A: Avaskuläres Tumorstadium; B: Dilatation und Erhöhung der Blutgefäßpermeabilität; C: Gefäßsprossung; D: Entwicklung und Reifung neuer Blutgefäße; E: Anschluss an bestehendes Blutgefäßsystem. Modifiziert nach Bergers & Benjamin (2003).

### 1.3 Die Wachstumsfaktoren der VEGF-Familie

Der Begriff VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), ursprünglich auch als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) bezeichnet (Dvorak *et al.*, 1979; Senger *et al.*, 1983), beschreibt eine multifunktionale Familie von Glykoproteinen, die durch unterschiedliche Genlokalisationen auf verschiedenen Chromosomen in die Faktoren VEGF(-A), -B, -C, -D und PlGF eingeteilt wird (Birk *et al.*, 2008; Ylä-Herttuala *et al.*, 2007). Darüber hinaus werden die viralen VEGF-Homologe, zusammengefasst als VEGF-E bezeichnet, sowie das im Schlangengift nachgewiesene VEGF-F unterschieden (Ogawa *et al.*, 1998; Yamazaki *et al.*, 2003). VEGF besteht aus einem antiparallelen Homodimer, das durch intermolekulare Disulfidbrücken verknüpft ist und je nach beschriebenem Organismus ein Molekulargewicht zwischen 34 und 46 kDa aufweist (Muller *et al.* (1997); Siemeister *et al.* (1998), Abb. 1.5).



**Abb. 1.5: VEGF-Struktur.** Darstellung als Monomer (A) und Homodimer (B) nach Hoebe (2004).

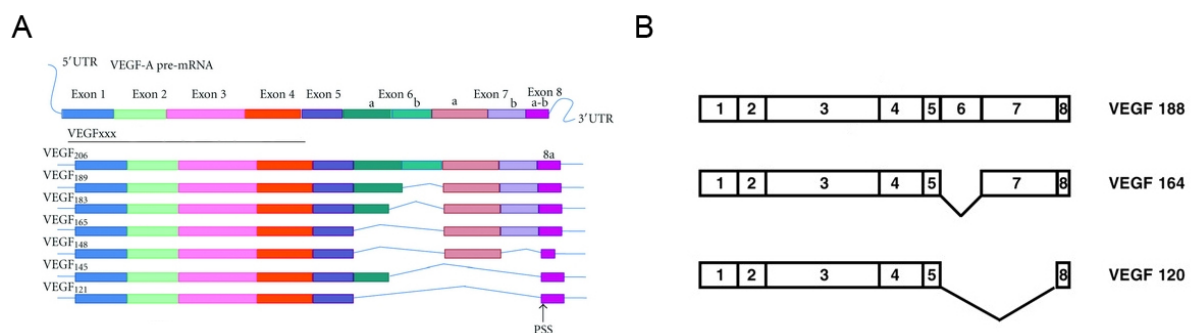
#### 1.3.1 Isoformen und Funktionen von VEGF

VEGF (auch bekannt als VEGF-A) ist bezüglich der Stimulation der Endothelzellproliferation und der Wirkung auf die Gefäßpermeabilität der bedeutendste Vertreter aus der VEGF-Familie und ist als einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren bei der Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems sowie für die Angiogenese im adulten Organismus von essentieller Bedeutung (Ferrara & Keyt, 1997; Neufeld *et al.*, 1999). So führt die homozygote und heterozygote Deletion von VEGF in transgenen Mäusen zur embryonalen Letalität (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996; Haigh *et al.*, 2000).

In humanen Zellen existieren durch alternatives Splicing mindestens sieben verschiedene VEGF-Isoformen, die für Proteine mit einer Länge von 121, 145, 148, 165, 183, 189 und

206 Aminosäuren kodieren (Ferrara *et al.* (1991); Hilmi *et al.* (2012); Jingjing *et al.* (1999); Leung *et al.* (1989); Mineur *et al.* (2007); Poltorak *et al.* (1997); Whittle *et al.* (1999), Abb. 1.6 A). Murines VEGF liegt durch alternatives Splicing in drei verschiedenen Isoformen vor (Mattot *et al.* (2002); Stalmans *et al.* (2002), Abb. 1.6 B). Diese Proteine unterscheiden sich jeweils nur durch kurze Domänen am C-Terminus, was jedoch einen großen Einfluss auf ihre biologische Funktion hat und ihre Interaktion mit Heparan-Sulfaten und dem Co-Rezeptor Neuropilin steuert (Stalmans *et al.*, 2002; Suarez *et al.*, 2006).

Humanes VEGF<sub>165</sub> und murines VEGF<sub>164</sub> sind die am besten beschriebenen Splicevarianten und spielen neben der Embryonalentwicklung vor allem bei der Tumorangiogenese eine wichtige Rolle (Woolard *et al.*, 2009). VEGF<sub>165</sub> ist für das Wachstum zahlreicher Tumore essentiell und in vielen Tumorarten hochreguliert (Folkman, 2002; Gasparini, 2000; Li *et al.*, 2006; Tamura *et al.*, 2001; Uthoff *et al.*, 2002). Die Expression geht dabei von den Tumorzellen und nicht vom Endothel aus, was auf einen parakrinen Wirkmechanismus hindeutet (Ferrara & Keyt, 1997).

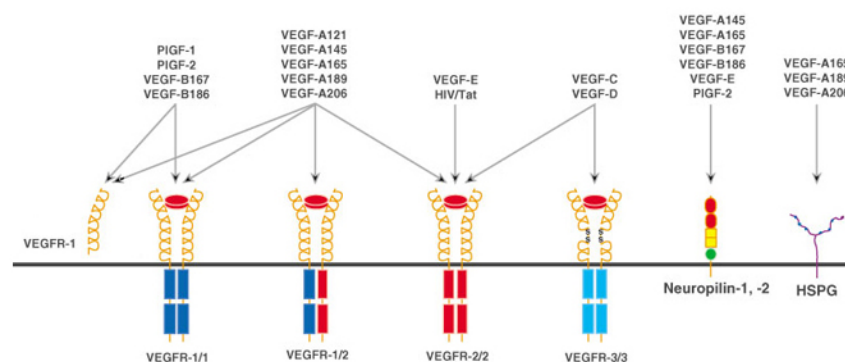


**Abb. 1.6: Schematische Repräsentation der beschriebenen humanen (A) und murinen (B) VEGF-Isoformen.** Modifiziert nach Damert *et al.* (2002); Hilmi *et al.* (2012).

### 1.3.2 VEGF-Rezeptoren und Signaltransduktion

Die angiogenen Wachstumsfaktoren der VEGF-Familie vermitteln ihre Wirkung über drei hochaffine Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. VEGF-Rezeptor-1 (*fms-like tyrosine kinase-1*, Flt-1), VEGF-Rezeptor-2 (*fetal liver kinase-1*, Flk-1) und VEGF-Rezeptor-3 (Flt-4) gehören zu der Familie der *Platelet-derived growth factor* (PDGF)-Rezeptoren und bestehen aus sieben extrazellulären Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen, einer transmembranen sowie einer intrazellulären Domäne, die die Tyrosin-Kinase-Domäne enthält (Ferrara, 2004; Pajusola *et al.*, 1992; Shibuya *et al.*, 1990). Die Expression der VEGF-Rezeptoren erfolgt in erster Linie auf Endothelzellen, konnte mittlerweile aber auch auf unterschiedlichen Nicht-Endothelzellen nachgewiesen werden (Clubbs & Bomser, 2007; Ishida *et al.*, 2001; Ohno-Matsui *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1995).

Die Bindung von VEGF bewirkt eine Dimerisierung der Rezeptoren, durch die die intrazelluläre Domäne der Tyrosin-Kinase strukturell verändert wird und letztendlich zu ihrer Aktivierung führt. Die Rezeptoren dimerisieren und phosphorylieren sich gegenseitig an den Tyrosin-Resten, welche über die spezifische Assoziation mit SH2-Proteinen die Signaltransduktion in den Zellen auslösen und die Proliferation induzieren (Ferrara & Davis-Smyth, 1997). Die verschiedenen VEGF-Formen zeigen eine unterschiedliche Spezifität hinsichtlich ihrer Bindung an die einzelnen VEGF-Rezeptoren (Abb. 1.7). VEGF bindet an VEGFR-1 und -2. Die Interaktion mit VEGFR-2 ist dabei essentiell für die Induktion der Angiogenese, wohingegen VEGFR-1 während der Embryonalentwicklung eine supprimierende Wirkung auf proangiogenetische Signale ausübt und so die Hämangiogenese in einem physiologischen Gleichgewicht hält (Hiratsuka *et al.*, 2001; Waltenberger *et al.*, 1994; Zachary, 1998). Die Liganden VEGF-B und PlGF binden an VEGFR-1, VEGF-C und -D an VEGFR-2 und -3. VEGF-E interagiert lediglich mit VEGFR-2. Neben der Bindung ihres spezifischen Liganden VEGF interagieren die VEGF-Rezeptoren noch mit Co-Rezeptoren wie Neuropilin-1 und -2 oder Heparin. Diese Co-Rezeptoren sind zwar nicht zur Signaltransduktion befähigt, aber in der Lage, die VEGF-vermittelte Bindung an VEGFR zu modulieren.

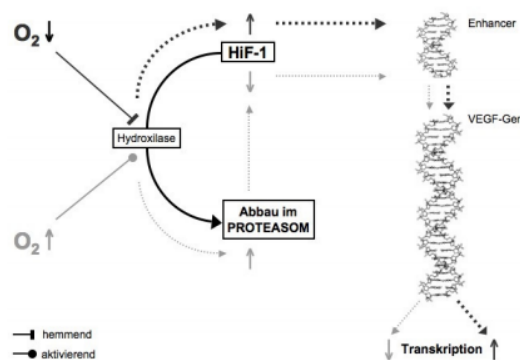


**Abb. 1.7: VEGF-Signaltransduktionswege.** Gezeigt sind die Interaktionen zwischen VEGF bzw. VEGF-Homologen und ihren entsprechenden Tyrosin-Kinase-Rezeptoren VEGFR (Matsumoto & Claesson-Welsh, 2001).

### 1.3.3 Regulation der VEGF-Expression

Die Expression von VEGF wird durch unterschiedliche Faktoren reguliert, wobei das Auftreten von Hypoxie zu den stärksten Stimuli gezählt wird (Shweiki *et al.*, 1992). Der Zusammenhang zwischen sinkendem Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) und steigender VEGF-Expression wurde bereits eingehend untersucht und in verschiedenen *in vivo* und *in vitro*-Versuchen gezeigt (Ankoma-Sey *et al.*, 2000; Minchenko *et al.*, 1994). Die sauerstoffabhängige Regulation wird dabei in erster Linie durch den Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor HIF-1 kontrolliert (Abb. 1.8). Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 durch sauerstoffabhängige Prolinhydroxylasen (PHD) hydroxiliert und im weiteren Verlauf proteosomal degradiert (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). Die Aktivität der Prolinhydroxylasen ist sauerstoffabhängig und unter hypoxischen Bedingungen vermindert wirksam, wodurch die Konzentration von HIF-1 ansteigt und somit zu einer erhöhten VEGF-Expression führt (Ke & Costa, 2006; Levy *et al.*, 1995). Auf posttranskriptioneller Ebene wird darüber hinaus die Halbwertszeit der VEGF-mRNA unter Hypoxie von ca. 30 Minuten auf etwa 2,5 Stunden signifikant erhöht (Stein *et al.*, 1995).

Neben hypoxischen Bedingungen führt Glukosemangel und die Aktivierung von Onkogenen bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zu einer Induktion der VEGF-Expression (Semenza, 2003; Shweiki *et al.*, 1995). Abhängig vom Zelltyp können zudem bestimmte Hormone die VEGF-Konzentration regulieren. Wichtige Vertreter sind dabei das Cortisol und verwandte Glukokortikoide als hemmende Faktoren sowie das Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) als Stimulator der VEGF-Expression (Gaillard *et al.*, 2000; Gloddek *et al.*, 1999; Nauck *et al.*, 1998; Vittet *et al.*, 2000). Darüber hinaus modulieren verschiedene Zytokine, wie z.B. TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , EGF, IL-1- $\alpha/\beta$ , IL-6 und IGF-I die Expression und Freisetzung von VEGF (Cohen *et al.*, 1996; Detmar *et al.*, 1995; Ferrara & Davis-Smyth, 1997; Frank *et al.*, 1995; Goldman *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995; Pertovaara *et al.*, 1994; Warren *et al.*, 1996).



**Abb. 1.8: Regulation der VEGF-Expression durch den Hypoxie-induzierbaren Faktor HIF-1.** Schematische Darstellung sinngemäß nach Hoeber (2004).

## 1.4 VEGF als therapeutisches Ziel zur Behandlung solider Tumore

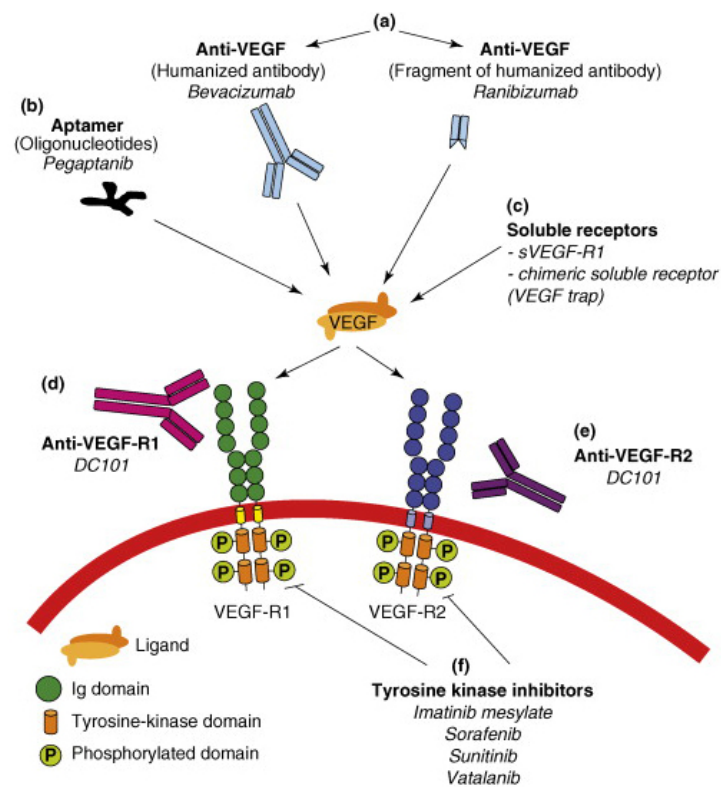
Unter einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren zählt VEGF im Rahmen des Tumorwachstums zu einem der wichtigsten angiogenen Faktoren. Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, VEGF freizusetzen und somit die Rekrutierung von Endothelzellen in das Tumorgewebe zu induzieren, die letztendlich durch den Anschluss an ein bestehendes Blutgefäßsystem den Wechsel vom avaskulären zum vaskulären Wachstum ermöglicht. Diese Erkenntnis führte zu der Entwicklung von antiangiogenen Therapieansätzen, welche die zielgerichtete Blockade von VEGF und die damit verbundene Inhibierung der Entwicklung neuer Blutgefäße vorsieht (Ellis & Hicklin, 2008).

### 1.4.1 Klassische Anti-VEGF-Behandlungsansätze

Es existieren grundsätzlich vier potentielle Anti-VEGF-Strategien, durch die die VEGF-Signalkaskade beeinflusst und somit die Bildung neuer Blutgefäße im Tumor verhindert werden sollen (Abb. 1.9). Der Antikörper Bevacizumab (Avastin<sup>TM</sup>, Genentech, USA) bindet und neutralisiert VEGF und verhindert dadurch die Bindung an seinen Rezeptor (Jain, 2002). VEGF-*trap* (Aventis, Strassburg, Frankreich), ein löslicher dimerer Rezeptor, bestehend aus Teilen der extrazellulären VEGFR-1 und -2-Domänen, bindet sämtliche Mitglieder der VEGF-Familie inklusive PlGF (Huang *et al.*, 2003). Neben neutralisierenden VEGF-Antikörpern wurden darüber hinaus zahlreiche Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren entwickelt, durch die eine Reduzierung tumoraler Blutgefäße einhergehend mit einer Verzögerung des Tumorwachstums sowie der Metastasierung erreicht werden kann (Angelov *et al.*, 1999; Shaheen *et al.*, 1999; Vajkoczy *et al.*, 1999). Eine weitere Möglichkeit der Unterbindung des VEGF-Signals bietet der Einsatz sogenannter Aptamere. Dabei handelt es sich um DNA- oder RNA-Moleküle, die Zielproteine binden und neutralisieren (Kaur *et al.*, 2013; Nonaka *et al.*, 2013).

Der Erfolg der Antiangiogenese als Monotherapie im Rahmen der Krebsbehandlung ist allerdings hinter den Erwartungen zurückgeblieben (Hurwitz *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 2007), wohingegen eine kombinierte Verabreichung mit Chemotherapeutika den Effekt einer alleinigen Chemotherapie in Abhängigkeit vom Tumortyp deutlich übersteigt (Hurwitz, 2004). Diesen Effekt der antiangiogenen Therapie führt man darauf zurück, dass die Blutgefäße in diesen Tumoren in ihren Eigenschaften eher Gefäßen aus gesundem Gewebe ähneln und dadurch die Gesamtdurchblutung und somit die Verteilung der Chemotherapie innerhalb des Tumors verbessert sind. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer Normalisierung der Tumorgefäße, durch die die Chemotherapeutika ihre Wirkung in Bereichen des Tumors entfalten können, in die sie ohne antiangiogene Therapie nicht gelangen (Jain, 2005).





**Abb. 1.9: Antiangiogene Therapieansätze.** A: Monoklonale Antikörper binden an VEGF; B: Aptamere binden VEGF; C: VEGF-*trap* bindet VEGF und PlGF; D: Monoklonale Antikörper binden an VEGFR-1; Monoklonale Antikörper binden an VEGFR-2. (Noël *et al.*, 2007).



### 1.4.2 Zielgerichtete Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen

Es ist bekannt, dass Tumore nicht nur aus neoplastischen Zellen bestehen, sondern ebenfalls aus verschiedenen stromalen Zellen, Blutgefäßen, Immunzellen sowie nichtzellulären Bestandteilen der extrazellulären Matrix, die gemeinsam das Tumormikromilieu bilden (Gasser & Raulet, 2006; Murdoch *et al.*, 2008). Die einzelnen Komponenten des Tumors treten dabei in Interaktion und schaffen so eine Umgebung, die entscheidenden Einfluss auf die Tumorprogression nimmt. Aufgrund dieser Eigenschaften bietet das Stroma einen Angriffspunkt für neue potentielle Therapieansätze. Neben VEGF, das von Tumorzellen sezerniert wird, trägt stromales VEGF in vielen Tumorentitäten zur Tumorangiogenese bei (Dong *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2000; Pilch *et al.*, 2001). Nach Inokulation von humanen Tumorzellen in immun-inkompetente Mauslinien konnte gezeigt werden, dass Avastin<sup>TM</sup>, das nur humanes Tumorzell-VEGF inhibiert, insbesondere für Tumorarten mit hohem stromalen VEGF-Anteil eine geringe Effizienz bezüglich der Inhibierung des Tumorwachstums hat (Liang *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nicht VEGF aus Tumorzellen für eine maligne Aszites verantwortlich ist, sondern VEGF aus stromalen Komponenten (Guleng *et al.*, 2005).

Aus verschiedenen Mausmodellen sowie der Analyse humaner Tumorbiopsien weiß man, dass neben den Tumorzellen selbst auch aus dem Knochenmark stammende myeloische Zellen, zu denen dendritische Zellen, Granulozyten, Makrophagen sowie Mastzellen zählen, in maligne Tumore einwandern, dort vermehrt VEGF freisetzen und somit zur Gefäßneubildung beitragen (Murdoch *et al.*, 2008). Tiere mit einer gezielten genetischen Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen zeigen hierbei eine Normalisierung der Gefäße in subkutan implantierten Lewis Lung Carcinoma-Tumoren und sprechen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren besser auf eine chemotherapeutische Behandlung an (Stockmann *et al.*, 2008). Darüber hinaus bewirkt eine Anti-VEGF-Therapie in Kombination mit einer Depletion myeloischer Zellen eine stärkere Inhibierung des Tumorwachstums im Vergleich zu einer alleinigen Anti-VEGF-Behandlung (Shojaei *et al.*, 2007).

## 1.5 Effekte der chemotherapeutischen Behandlung

Konventionelle Behandlungsmethoden von Tumorerkrankungen, bei denen ein chirurgischer Eingriff nicht möglich ist oder keine vollständige Entfernung des Tumorgewebes gewährleistet, beruhen neben der Bestrahlung des Tumors hauptsächlich auf der Anwendung von Chemotherapeutika. Die klassische Chemotherapie erfolgt dabei mit Zytostatika, die die Zellteilung hemmen. Aufgrund einer stärkeren Zellproliferation maligner Tumorzellen reagieren diese verstärkt auf eine Störung der Zellteilung.

### 1.5.1 Tumorsuppression durch Apoptose und Seneszenz

Chemotherapeutische Substanzen erzielen ihre antitumorale Wirkung in erster Linie durch die Inhibierung des Zellzyklus sowie die Induktion von Apoptose in den Tumorzellen (Barry *et al.*, 1990; Fisher, 1994; Kerr *et al.*, 1994). Die zytotoxische Behandlung bewirkt dabei eine Schädigung der DNA, die als Initialantwort der Zelle zu einer Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 führt. Die Aktivierung von p53 führt im weiteren Verlauf zu einem Arrest des Zellzyklus in der G1- bzw. G2/M-Phase und einer Reparatur der DNA-Schädigung oder bei stärkeren Schäden zu einer Eliminierung der betroffenen Zelle durch Apoptose (Agarwal *et al.*, 1995; Kroemer *et al.*, 2007). Eine Vielzahl maligner Tumore weist jedoch eine Mutation von p53 auf, durch die im Rahmen einer zytotoxischen Behandlung die p53-vermittelte Apoptose der Tumorzellen nicht mehr effizient erfolgen kann (Bode & Dong, 2004; Dumay *et al.*, 2013; Soussi & Bérout, 2001).

Wildtyp-p53 induziert die Expression zahlreicher, funktionell verschiedener Gene, die beispielsweise bei der Zelldifferenzierung, Induktion von DNA-Reparaturmechanismen, der Kontrolle des Zellzyklus und insbesondere bei der Induktion von Seneszenz eine wichtige Rolle spielen (Hofseth *et al.*, 2004). Die zelluläre Seneszenz stellt einen dauerhaften Zustand des Zellzyklus-Arrests dar, durch den die Zelle die Fähigkeit verliert zu proliferieren, jedoch über einen langen Zeitraum lebensfähig und metabolisch aktiv bleibt (Sherwood *et al.*, 1988). Dabei werden grundsätzlich zwei Arten der zellulären Seneszenz unterschieden. Die replikative Seneszenz beschreibt die Auslösung des Seneszenz-Programms nach Erreichen einer kritischen Telomerlänge (Martens *et al.*, 2000). Als Telomere werden Nukleoprotein-Komplexe beschrieben, die an den Enden der Chromosomen sitzen und nach jedem Zellzyklus-Durchlauf ein Stück verkürzt werden. Die zweite Form wird als induzierbare bzw. prämaturre Seneszenz bezeichnet, die bei zellulärem Stress ausgelöst werden kann und somit Telomer-unabhängig ist (Chen *et al.*, 2004; Zhang, 2007). Die p53-p21-Signalachse stellt einen möglichen Mechanismus der zellulären Seneszenzinduktion dar (Sugrue *et al.*, 1997). Eine Erhöhung der p53-Aktivierung bewirkt die Induktion der Expression von p21, ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase, der bei hoher Expression einen G1-Arrest der Zelle hervorruft (Sherr & Roberts, 1999). Eine erhöhte p21-Expression ist somit charakteristisch und ein akzeptierter Marker für seneszente Zellen. Weitere Expressionsmarker für seneszente Zellen sind die CDK-Inhibitoren p16, p19 und p27 (Kuilman & Peeper, 2009; Kuilman *et al.*, 2010). Darüber hinaus wurden bereits weitere Merkmale zur Identifikation seneszenten Zellen beschrieben (Rodier & Campisi, 2011). Neben einer morphologischen Änderung, bei der die Zellen ihre ursprüngliche Form verlieren und große, flache Strukturen ausbilden, exprimieren seneszente Zellen eine sogenannte Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal), die in Lysosomen bei einem pH-Wert von 6 eine hohe Aktivität besitzt. Durch die beschriebene morphologische Veränderung nimmt der Anteil der Lysosomen in seneszenten Zellen zu und ermöglicht die Detektion

des Enzyms bei suboptimalem pH-Wert (Kurz *et al.*, 2000). Darüber hinaus zeigen Zellen nach Seneszenzinduktion eine Hochregulierung immunzellregulierender und inflammatorischer Faktoren, durch die sie in parakriner Weise ihre Umgebung beeinflussen können (Rodier, 2013). Dieses veränderte Expressionsprofil wird auch als Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp (SASP) bezeichnet und ist dafür bekannt, eine Vielzahl anti-, aber auch protumoraler Prozesse zu initiieren (Coppé *et al.*, 2010).

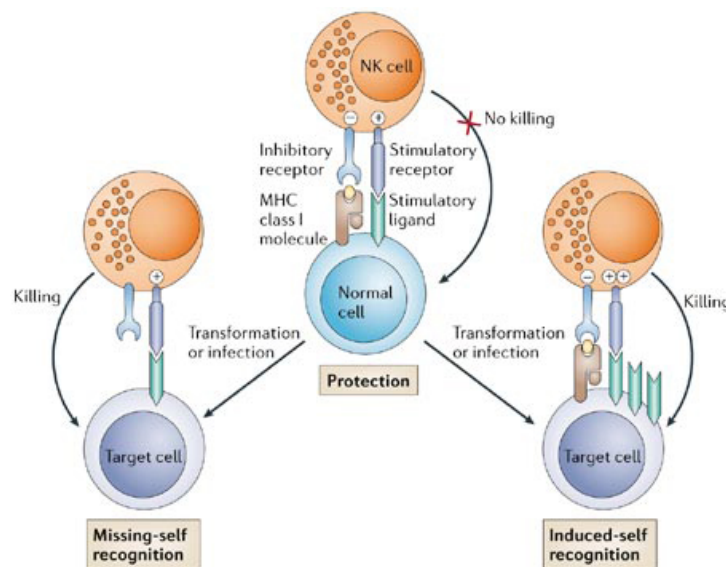
Viele *in vitro* und *in vivo* Versuche zeigen, dass im Zusammenhang mit einer chemotherapeutischen Behandlung neben der Apoptose eine prämaturre Seneszenz der Tumorzellen ausgelöst werden kann (Chang *et al.*, 1999b; Park *et al.*, 2000; Schmitt *et al.*, 2002; Shay & Roninson, 2004; te Poele *et al.*, 2002). Diese „Therapie-induzierte Seneszenz“ (TIS) bewirkt durch den irreversiblen Zellarrest in erster Linie eine Reduzierung des Tumorwachstums und verhindert somit eine neoplastische Transformation, d.h. die Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle. Darüber hinaus belegen aktuelle Studien, dass seneszente Zellen bedingt durch ihren SASP eine verstärkte Rekrutierung von Immunzellen auslösen, die im Gegenzug arretierte Zellen erkennen und eliminieren können und somit zur Tumorregression beitragen (Xue *et al.*, 2007).

### 1.5.2 Antitumorantwort durch Immunzellen

Tumorzellen können über die humorale Immunantwort oder über zelluläre Mechanismen erkannt und eliminiert werden. Die zelluläre Immunantwort erfolgt dabei über spezifische Zellen des angeborenen oder adaptiven Immunsystems. Hauptverantwortlich für die Tumorabwehr durch das Immunsystem sind die Subpopulationen der T-Zellen, die MHC-I- bzw. MHC-II-Peptid-Komplexe auf den Zielzellen erkennen und diese im Anschluss selektiv töten. Tumorassoziierte Antigene (TAA) sind dabei die Voraussetzung für die T-Zell-vermittelte Immunantwort (Pardoll & Topalian, 1998). Im Gegensatz dazu erfolgt die Eliminierung von Tumorzellen durch das angeborene Immunsystem, zu dem Makrophagen und NK-Zellen zählen, unabhängig von spezifischen Antigenen.

Die antitumorale Immunantwort kann dabei durch die Behandlung mit Chemotherapeutika gesteigert werden und wurde bereits anhand verschiedener T-Zell-basierter Studien gezeigt (Zitvogel *et al.*, 2008a,b). Durch ihre Fähigkeit, Tumorzellen zielgerichtet zu erkennen und effizient zu lysieren, wird darüber hinaus NK-Zellen eine immer bedeutendere Funktion im Rahmen der Tumorabwehr zugesprochen. Sie sind in der Lage, ohne vorherige Immunisierung die Tumorentwicklung in einer frühen Phase einzuschränken und die Tumormetastasierung zu vermindern (Halftack *et al.*, 2009; Ksienzyk *et al.*, 2011; Smyth *et al.*, 2005; Talmadge *et al.*, 1980). NK-Zellen wurden zudem im Zusammenhang mit der sogenannten Immunüberwachung seneszenten Zellen beschrieben, d.h. sie sind in der Lage, seneszente Zellen im Tumor zu eliminieren und somit zur Regression des Tumors beizutragen (Krizhanovsky *et al.*, 2008).

NK-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche eine Vielzahl aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren, die mit NK-Zell-Liganden auf der Oberfläche der Zielzelle interagieren (Abb. 1.10). Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wird über das Gleichgewicht aktivierender und inhibitorischer Signale bestimmt (Farag *et al.*, 2002; Lanier, 1998; Moretta *et al.*, 2002). Dabei führt eine Herunterregulierung (*missing-self recognition*) bzw. eine Hochregulierung (*induced-self recognition*) der Liganden auf der Zielzelle zur NK-Zell-vermittelten Lyse. NK-Zellen exprimieren drei Liganden der TNF-Familie, FasL, TNF- $\alpha$  sowie TRAIL. Durch Interaktion dieser Liganden mit den entsprechenden Rezeptoren auf der Zielzelle werden apoptotische Vorgänge induziert (Bradley *et al.*, 1998; Kägi *et al.*, 1994b; Kayagaki *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2001). Der gängigere Mechanismus der Zell-Lyse ist jedoch die Freisetzung lytischer Granula, die Perforin und Granzyme enthalten (Kägi *et al.*, 1994a; Smyth *et al.*, 1999). Über Endozytose gelangen die Granzyme in das Zytoplasma der Zielzelle und aktivieren das Apoptose-fördernde Protein Caspase. NK-Zellen können darüber hinaus zahlreiche Interleukine sowie Zytokine sezernieren. Die wichtigsten Vertreter sind Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und - $\beta$  sowie TGF- $\beta$  (Fauriat *et al.*, 2010; Yokota *et al.*, 2013). Die Freisetzung verschiedener Interleukine, wie z.B. IL-1, IL-12, IL-15 und IL-18 durch dendritische Zellen fördert die Reifung und zytotoxische Aktivität der NK-Zellen sowie die erhöhte Ausschüttung von IFN- $\gamma$  (Fernandez *et al.*, 1999).



**Abb. 1.10: NK-Zellen und ihre Aktivierung über inhibierende bzw. aktivierende Rezeptoren.** Die Herunter- oder Hochregulierung von NK-Zell-Liganden auf der Zielzelle bewirkt die NK-Zell-vermittelte Lyse durch Apoptose-Induktion oder Freisetzung lytischer Granula (Raulet & Vance, 2006).

### 1.5.3 Tumorresistenz und Tumorrückbildung

Die Wirkstoffresistenz ist ein entscheidender Faktor, der die Effizienz einer chemotherapeutischen Behandlung maligner Tumore beeinflusst. Dabei können Tumore bereits unabhängig von einer Chemotherapie eine intrinsische Resistenz aufweisen oder aber im Laufe der Behandlung eine sekundäre Resistenz entwickeln (Kerbel *et al.*, 1994). Die Ursachen der Resistenz sind vielfältig (Abb. 1.11). Ein möglicher Mechanismus ist die Veränderung des intra- und extrazellulären Transports des Wirkstoffs, so dass dieser nur in unzureichender Konzentration in der Tumorzelle vorliegt. Hierbei spielt u.a. die verstärkte Expression des ABC (*ATP binding cassette*)-Transporter-Proteins eine wichtige Rolle, durch das eine Vielzahl strukturell und funktionell unterschiedlicher Zytostatika ihre Wirkung verlieren (Gottesman *et al.*, 2002). Des weiteren können zytoplasmatische Thiole wie Glutathion oder Metallothionein die biologische Inaktivierung Platinkomplex-basierender Zytostatika bewirken (Meijer *et al.*, 1992). Durch Chemotherapie induzierte DNA-Schäden werden in Zellen in erster Linie durch den Mechanismus der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) repariert. Verschiedene Studien belegen für chemotherapeutisch resistente Zellen eine verstärkte Expression von NER-Proteinen, durch die die Fähigkeit der Tumorzelle steigt, DNA-Schäden zu reparieren (Kelland, 1994). Der Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens p53 in Tumorzellen und die damit eingeschränkte Möglichkeit apoptotische Signalwege einzuleiten, geht ebenfalls mit einer verstärkten Resistenz gegenüber Zytostatika einher (Ahnen *et al.*, 1998; Fan *et al.*, 1994; Liang *et al.*, 2002; Perego *et al.*, 1996). Weitere Mechanismen für eine Chemoresistenz, insbesondere gegenüber antiangiogener Therapien, entwickelt der Tumor durch die alternative Neubildung von Blutgefäßen in Form von sprossender Angiogenese, Intususzeption, vaskulärer Kooption sowie postnataler Vaskulogenese, bei der endotheliale Vorläuferzellen oder Tumorstammzellen rekrutiert werden (Loges *et al.*, 2010; Monzani & Porta, 2008). Obwohl die molekularen Mechanismen für diese beschriebenen Prozesse größtenteils unbekannt sind, liegt es nahe, dass die Einzelbehandlung mit einem VEGF-Antikörper nicht alle Formen der Gefäßneubildung gleichermaßen hemmen kann. Im Zusammenhang mit einer Resistenz gegenüber Anti-VEGF-Therapien kann darüber hinaus die Permeabilität der Blutgefäße im Tumor einen wichtigen Einfluss ausüben. So zeigen Nakasone *et al.* (2012), dass die Inaktivierung von MMP9, einer Matrixmetalloproteinase, die die Permeabilität der Blutgefäße reguliert, zu durchlässigeren Gefäßen führt, durch die Chemotherapeutika besser im Tumor verteilt werden und somit besser wirken können. Der Erfolg chemischer Inhibitoren für verschiedene MMP Enzyme hinsichtlich einer erfolgreichen Tumorbehandlung in klinischen Studien ist bislang jedoch noch nicht bestätigt worden.

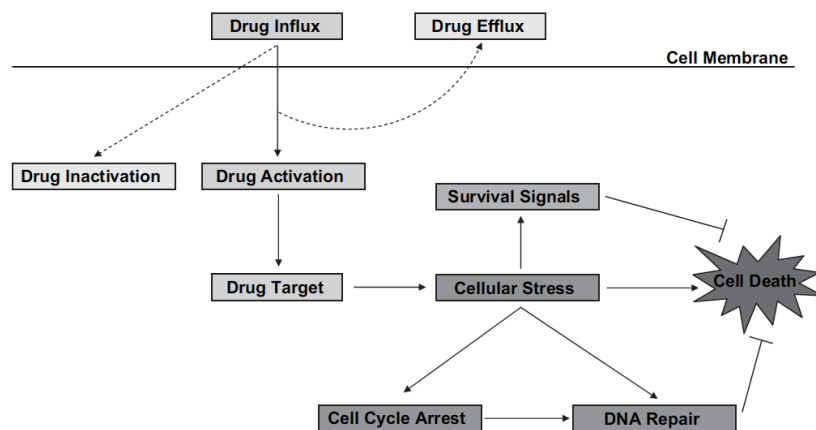


Abb. 1.11: Wirkstoff-Resistenzmechanismen in soliden Tumoren nach Wilson *et al.* (2006).

Neben der Therapieresistenz stellt das Wiederkehren des Tumors nach Beendigung der Therapie, das sogenannte Tumorrezidiv, ein weiteres Problem im Rahmen der Behandlung maligner Tumore dar. Hierbei kommt es trotz initial erfolgreicher Therapie zu einem raschen Nachwachsen des Tumors nach Beendigung der therapeutischen Maßnahmen. Somit sind das initiale Ansprechen eines Tumors auf therapeutische Maßnahmen sowie dessen Wachstumsverhalten nach Beendigung einer Therapie entscheidende Faktoren, die die Lebenserwartung des Patienten bestimmen. Das Tumorrezidiv hängt u.a. von der Tumorart und dessen Ausmaß zum Zeitpunkt der Therapie sowie der Metastasierung ab, bei der es zur Absiedlung der Tumorzellen im Knochen oder anderen Organen kommt.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Der Prozess der Tumorangiogenese ist entscheidend für das Wachstum und die Metastasierung maligner Tumore. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ist dabei einer der bedeutsamsten angiogenen Wachstumsfaktoren und induziert in soliden Tumoren die Ausbildung neuer Blutgefäße. Tumordinfiltrierende myeloische Zellen können neben den Tumorzellen selbst große Mengen VEGF sezernieren. Wie bereits gezeigt werden konnte, führt die spezifische Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen zu einer erhöhten Funktionalität intratumoraler Blutgefäße und infolge einer verbesserten Durchblutung sowie einer gesteigerten Sauerstoffversorgung zu einem initial besseren Ansprechen des Tumors auf eine chemotherapeutische Behandlung mit Zytostatika.

Basierend auf diesen Ergebnissen soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwiefern das Fehlen von myeloid Zell-spezifischem VEGF einen Einfluss auf die Rezidivbildung von Tumoren nach chemotherapeutischer Behandlung ausübt. Anhand eines Mausmodells, das eine genetische Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen ermöglicht (KO-Mäuse), sollen daher zunächst Wachstumskurven für subkutane Lewis Lung Carcinoma- und B16F10-Tumore erstellt werden. Hierzu werden Tumorzellen subkutan in WT- und KO-Mäuse injiziert und nach sichtbarer Tumorbildung insgesamt dreimal im Zwei-Tages-Rhythmus durch intraperitoneale Injektion mit Cisplatin behandelt, bevor die Tumore nach Therapieende bzw. nach erfolgtem Rezidiv entnommen werden. Unbehandelte Tumore aus WT- und KO-Mäusen dienen als Vergleich für das erfolgreiche Ansprechen behandelter Tiere auf die Chemotherapie. Da es sich um einen spezifischen Knockout für den angiogenen Wachstumsfaktor VEGF handelt, ist die anschließende Charakterisierung des Gefäßphänotyps sowie der Oxygenierung behandelter und unbehandelter Tumore ein Schwerpunkt dieser vorliegenden Arbeit. Darüber hinaus soll genauer untersucht werden, inwiefern sich der Verlust von myeloid Zell-spezifischem VEGF auf die chemotherapeutische Wirkung in Bezug auf den Tumor und insbesondere das Immunsystem als Bestandteil des Tumormikromilieus auswirkt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bedeutung von VEGF in myeloischen Zellen im Rahmen der Therapie maligner Tumore zu ermitteln und somit eine Grundlage für neue Therapieansätze zu schaffen, mit denen der Erfolg der Chemotherapie hinsichtlich der Tumorbehandlung verbessert werden kann.

## 3 Material & Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tab. 3.1: Verwendete Geräte mit Herstellerbezeichnung.**

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Absaugpumpe	Schuett (Biotec)
Analysewaage	Pioneer (Ohaus)
Autoklav	Varioklav (Thermo Scientific)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Hera Cell 240 (Thermo Scientific)
Durchflusszytometer	LSRII (BD Bioscience)
Feinwaage	Ken GS (Satorius)
Fluoreszenz- und Chemilumineszenzsystem	Fusion-FX7 (Peglab)
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse E1000 (Nikon)
Horizontales Elektrophoresesystem (DNA)	hausinterne Anfertigung
Kamerasystem	Nikon DS Ri1
Kryotom	Thermo Scientific
Lichtmikroskop	CK40 (Olympus)
Magnetrührer	KMO2 (IKA)
Mikroliterpipetten	Gilson
Millipore-System	TKA-Micro (TKA)
PCR-Gerät	Mastercycler (Eppendorf)
pH-Meter	Eutech Instruments
Photometer	Epoch (Biotek)
Pipettierhilfe	IBS Integra Biosciences
Plattform-/Heizschüttler	Polymax 1040 (Heidolph)
Präparationsbesteck	Aesculap
Realtime PCR-Gerät	IQ5 iCycler (Bio-Rad)
Sterile Werkbank	HERAsafe (Heraeus)
UV-Geldokumentationsanlage	BioDoc-It (UVP)
Vertikales Elektrophoresesystem (Protein)	Mini-Protean 3 (Bio-Rad)
Vortexer	Select (Bioproducts)
Western Blot-Kammer	Mini Trans-Blot <sup>®</sup> Cell (Bio-Rad)
Zählkammer	Neubauer (Ratiomed)
Zentrifugen	Eppendorf und Heraeus



**Tab. 3.2: Verbrauchsmaterialien.**

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläschen	Waldeck
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Filter	Sartorius Stedim
Filterpapier GB303	Whatman
Kanülen	BD Bioscience
Nitrozellulose-Membranen	Schleicher & Schuell
Nylonnetze	BD Bioscience
Pipettenspitzen	Biozym
Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner
Polysine-Objektträger	Langenbrinck
Reaktionsgefäße (0,2 - 2 ml)	Eppendorf
Reaktionsplatten (6-well, 96-well)	Sarstedt
Serologische Pipetten	Sarstedt
Spritzen	Terumo
Zellkulturflaschen	Sarstedt

### 3.1.2 Chemikalien

**Tab. 3.3: Verwendete Chemikalien.**

Bezeichnung	Hersteller
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	BD Bioscience
Agarose	Invitrogen
Aceton	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	Bio-Rad
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
Bovine serum albumin (BSA)	SERVA
Cisplatin (CDDP)	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco
Essigsäure (100 %)	Fluka

---

Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom AG
Guanidinthiocyanat (GTC)	Roth
Glycerin	Merck
Glycin	Fluka
Isofluran	Baxter
Isopropanol	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck
Kollagenase (Type III)	Worthington
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Sigma
Natriumacetat	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumfluorid (NaF)	Fluka
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Fluka
Normal goat serum (NGS)	Sigma
NTPs	Invitrogen
Penicillin	Gibco
Phenol	AppliChem
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	AppliChem
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Pimonidazol	HPI
Ponceau S	Sigma
Salzsäure (32 %)	Fluka
Streptomycin	Gibco
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Tris-aminomethan (TRIS)	Fluka
Triton	Applichem
Trypanblau	Merck
Trypsin-EDTA	Gibco
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Merck

---

### 3.1.3 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen, die nicht aufgelistet sind, wurden von kommerziellen Anbietern mitgeliefert. Sofern nicht anders angegeben, wurde zur Herstellung der Puffer und Lösungen Millipore-H<sub>2</sub>O verwendet.

<b>ACK-Puffer:</b>	135 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM NaHCO <sub>3</sub> 0,1 mM Na-EDTA
<b>Blockierungslösung: (IF, IHC)</b>	1x PBS-T 5 % (v/v) NGS
<b>Blockierungslösung: (WB)</b>	1x TBS-T 5 % (w/v) BSA
<b>DEPC-H<sub>2</sub>O:</b>	500 ml H <sub>2</sub> O 0,5 ml DEPC 1 h bei RT, autoklavieren
<b>FACS-Puffer:</b>	1x PBS 2,5 % (v/v) FCS 0,1 % (w/v) NaN <sub>3</sub>
<b>DNA-Ladepuffer (6x)</b>	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylenyanol FF 30 % (v/v) Glycerin
<b>Lysepuffer:</b>	DMEM 0,2 % (w/v) Kollagenase (Type III) 1 U/ml DNase I
<b>Lyse-Stop-Puffer:</b>	DMEM 10 % FCS
<b>PBS (1x):</b>	43 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137 mM NaCl 27 mM KCl 14 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
<b>PBS-T:</b>	1x PBS 0,05 % (v/v) Tween 20

---

<b>RIPA-Puffer:</b>	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 1 % (v/v) Triton 0,1 M NaF 1 mM NaOV 1 mM PMSF Protease-Inhibitor (1:10)
<b>Sammelgelpuffer:</b>	0,5 M Tris/HCl 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
<b>SDS-Laufpuffer:</b>	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
<b>SDS-Probenpuffer (4x):</b>	0,1 M Tris pH 6,8 4 % (v/v) 10 % SDS 10 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 5 % (v/v) 0,05 % Bromphenolblau 2 % (v/v) Glycerin
<b>TAE (1x):</b>	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM Na-EDTA pH 8,3
<b>TBS (1x):</b>	50 mM Tris/HCl 150 mM NaCl pH 7,4
<b>TBS-T:</b>	1x TBS 0,1 % (v/v) Tween 20
<b>Transferpuffer:</b>	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
<b>Trenngelpuffer</b>	1,5 M Tris/HCl 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8

### 3.1.4 Antikörper

**Tab. 3.4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.** DZ: Durchflusszytometrie; IF: Immunfluoreszenz; IHC: Immunhistochemie; WB: Western Blot.

Primärantikörper	Typisierung	Hersteller	Verdünnung
anti-CD4	Ratte	Biologend	1:200 (DZ)
anti-CD8	Ratte	Biologend	1:200 (DZ)
anti-Cd11c	Ratte	Biologend	1:200 (DZ)
anti-CD31	Ratte	Biologend	1:200 (IF)
anti-F4/80	Ratte	Serotec	1:200 (DZ)
anti-Ki-67	Ratte	Abcam	1:50 (IF)
anti-Mab-1	Maus	HPI	1:50 (IF)
anti-NK1.1	Maus	Biologend	1:400 (DZ)
anti-p21	Kaninchen	Oncogene	1:200 (IHC) 1:1000 (WB)
anti-p53	Kaninchen	Santa Cruz	1:200 (IHC) 1:1000 (WB)
anti-SMA- $\alpha$	Maus	Chemikon	1:500 (IF)
Sekundärantikörper	Antigen	Hersteller	Verdünnung
anti-Kaninchen Alexa 488	Ziege IgG	Invitrogen	1:200
anti-Maus Alexa 488	Maus IgG	Invitrogen	1:200
anti-Ratte Alexa 488/568	Ratte IgG	Invitrogen	1:200
anti-Kaninchen (biotinyliert)	Kaninchen IgG	Santa Cruz	1:200
anti-Kaninchen (HRP)	Kaninchen IgG	Cell Signalling	1:100000
anti-Ziege (biotinyliert)	Ziege IgG	Santa Cruz	1:200
anti-Maus (biotinyliert)	Maus IgG	Vector Labs	1:50

### 3.1.5 Oligonukleotide

**Tab. 3.5: Verwendete Primer zur Amplifikation der entsprechenden Gensequenz.** Die Spezifität wurde mittels PrimerBlast und PCR-Analyse bestätigt.

Gen	Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge (bp)
16S forward	AGATGATCGAGCCGCG	163
16S reverse	GCTACCAGGGCCTTTGAGATGGA	
CDKN1A forward	AGAGACAACGGCACACTTTG	137
CDKN1A reverse	CGGTGTCAGAGTCTAGGGGA	
CLRB forward	AGCACAAGACTCAGGGGAGA	118
CLRB reverse	GTGTGTCACAAAGGCTTCCC	
Cre forward	TGCAAGTTGAATAACCGGAAA	241
Cre reverse	CTAGAGCCTGTTTTGCACGTTC	
CSF-1 forward	TAGTGGTAGGCCACATTCCC	144
CSF-1 reverse	GGATGAGGACAGACAGGTGG	
CXCL1 forward	GTGCCATCAGAGCAGTCTGT	148
CXCL1 reverse	GCACCCAAACCGAAGTCATA	
CXCL2 forward	CATCAGGTACGATCCAGGCT	150
CXCL2 reverse	CCTGGTTCAGAAAATCATCCA	
IFN- $\gamma$ forward	TGAGCTCATTGAATGCTTGG	150
IFN- $\gamma$ reverse	AGGCCATCAGCAACAACATA	
IL-1 $\alpha$ forward	TGAGTTTTGGTGTCTTCTGGC	139
IL-1 $\alpha$ reverse	ATGTATGCCTACTCGTCGGG	
IL-1 $\beta$ forward	TTGTTGATGTGCTGCTGTGA	149
IL-1 $\beta$ reverse	TGTGAAATGCCACCTTTTGA	
IL-6 forward	TCTGAAGGACTCTGGCTTTG	142
IL-6 reverse	GATGGATGCTACCAAACCTGGA	
IL-10 forward	AGACACCTTGGTCTTGGAGC	140
IL-10 reverse	TTTGAATTCCCTGGGTGAGA	
IL-12 forward	TCTCCACAGGAGGTTTCTG	149
IL-12 reverse	ACAGAGTTCCAGGCCATCAA	
IL-15 forward	TGAAGATGAGCTGGCTATGG	142
IL-15 reverse	CACTGCCTCTTCATGGTCCT	

IL-18 forward	GGCCAAAGTTGTCTGATTC	144
IL-18 reverse	CCAAATCACTTCCTCTTGG	
MCP-1 forward	TCTCCAGCCTACTCATTGGG	144
MCP-1 reverse	AGGTCCCTGTCATGCTTCTG	
NCAM1 forward	CTCCTTGGCTGGGAACAATA	146
NCAM1 reverse	AAGGGGAAGGCACTGAATTT	
RAET1 forward	GTCATTTGGTCTGTGGGTCC	132
RAET1 reverse	GGGCCGCTGTAGTCAGTTAC	
Trp53 forward	AATGTCTCCTGGCTCAGAGG	127
Trp53 reverse	CTAGCATTCAGGCCCTCATC	
VCAM1 forward	ACCAAGGAAGATGCGCAGTA	139
VCAM1 reverse	CCGGCATATACGAGTGTGAA	
VEGF forward	AATGCTTTCTCCGCTCTGAA	143
VEGF reverse	GATCATGCGGATCAAACCTC	

### 3.1.6 Kommerzielle Kits

**Tab. 3.6:** Übersicht und Anwendungszweck verwendeter kommerzieller Kits.

Bezeichnung	Hersteller
DAB Peroxidase Substrat Kit, 3,3-diaminobenzidine	Vector Labs
DeadEnd™Fluorometric TUNEL System	Promega
ECL Advance Western Blotting Detection System	GE Amersham
GoTaq® DNA Polymerase	Promega
Mouse VEGF Quantikine ELISA Kit	R&D Systems
M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant	Promega
QIAEX II Gel Extraction System	Qiagen
Senescence-β-Galactosidase Staining Kit	Cell Signaling
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Labs
Vector Mouse on Mouse (M.O.M.™) Kit	Vector Labs

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe

Die Isolierung von RNA erfolgte mithilfe der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode nach Chomczynski & Sacchi (1987). Hierzu wurde das Tumorgewebe in GTC (1 ml pro mg Gewebe) homogenisiert und für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. 700 µl des Homogenisats wurden mit 70 µl Natriumacetat (2 M, pH = 4.0) angesäuert und anschließend mit 500 µl Phenol sowie 350 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol und erneuter Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C. Das resultierende Zellpellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Für die Isolation von RNA aus Zellen wurden die Zellpellets zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 700 µl GTC versetzt. Die restlichen Schritte erfolgten analog zur beschriebenen RNA-Isolierung aus Gewebe. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.2.2 Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA mit 5 µl Oligo-dT Primer und DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 12 µl gebracht. Der Ansatz wurde 10 min bei 68 °C inkubiert und nach Abkühlung auf Eis mit 13 µl RT-Mix (Tab. 3.7) versetzt. Die Umschreibung der RNA erfolgte im Thermocycler bei 45 °C für 90 min, 52 °C für 30 min und 95 °C für 15 min. Die cDNA wurde anschließend bei 4 °C gelagert.

**Tab. 3.7: Einzelansatz für den RT-Mix zur cDNA-Synthese.**

	Volumen (µl)
RT-Puffer (5x)	5
NTPs	5
Reverse Transkriptase	0,5
DEPC-H <sub>2</sub> O	2,5



### 3.2.3 Amplifizierung und Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert. Die PCR-Ansätze wurden dabei in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  durchgeführt (Tab. 3.8). Tab. 3.9 zeigt ein exemplarisches PCR-Programm, nach dem die DNA amplifiziert wurde. Abhängig von der Transkriptlänge und der spezifischen Annealing-Temperatur der verwendeten Primer wurden die entsprechenden Parameter angepasst. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte nach Sambrook (1989) in 1-2 %-igen Ethidiumbromid-Agarosegelen bei 100 V für 45 min. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht und mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid versetzt. Die Polymerisation des Gels erfolgte in Gelkammern mit entsprechendem Probentaschenkamm. Zur Auftragung der Proben wurden die PCR-Ansätze mit 6x DNA-Probenpuffer (Endkonzentration 1x) versetzt und nach erfolgreicher Auftrennung mittels UV-Licht in einer Geldokumentationskammer visualisiert. Zur Überprüfung der richtigen DNA-Fragmentlänge wurde ein Größenstandard (100 bp ladder, Invitrogen) verwendet.

**Tab. 3.8: Typischer PCR-Ansatz zur Amplifikation von DNA.**

	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
DNA-Template	1
PCR-Puffer (5 x)	10
NTPs (10 mM)	4
Primer forward (20 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ )	1
Primer reverse (20 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ )	1
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu\text{l}$

**Tab. 3.9: Exemplarisches PCR-Programm für die Amplifikation von DNA.** Die Annealing-Temperatur, die Elongationszeit sowie Zyklenzahl wurden der zu amplifizierenden DNA entsprechend angepasst.

	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Dauer (min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2	1
Denaturierung	95	1	x 30
Annealing	60	0,5	
Elongation	72	1	
Finale Elongation	72	4	1

### 3.2.4 Aufreinigung und Konzentration von DNA

DNA wurde aus PCR-Ansätzen mithilfe des QiaexII-Gelextraktions-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Hierzu wurden die PCR-Proben mit dem dreifachen Volumen an Q1-Puffer versetzt und nach Zugabe von 10 µl QiaexII-Partikeln 10 min bei RT inkubiert. Die Silikapartikel wurden nach einem kurzen Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm zweimal mit PE-Puffer gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Elution der DNA erfolgte mit 10 µl H<sub>2</sub>O.

### 3.2.5 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer (Epoch). Über das Verhältnis der gemessenen Absorptionen bei 260 und 280 nm konnte die Reinheit der Proben bestimmt werden. Für alle Studien wurden nur Proben verwendet, die ein Verhältnis zwischen 1,7 und 2,0 aufwiesen.

### 3.2.6 Quantitative Realtime-PCR

Für den quantitativen Nachweis der Genexpression wurden Reaktionsansätze von 50 µl je Probe erstellt (Tab. 3.10) und 2 x 20 µl als Doppelbestimmung in 96-well-Reaktionsplatten pipettiert. Parallel hierzu wurde zur Berechnung der C<sub>T</sub>-Werte und der PCR-Effizienz für das entsprechende Gen eine Standardreihe (1 pg/µl - 0,1 fg/µl, Verdünnungsfaktor 1:10) aufgetragen. Die PCR-Reaktion mit gleichzeitiger Fluoreszenz-Messung erfolgte in einem Zwei-Schritt-Programm mithilfe des iCycler Detektionssystem von Bio-Rad (Tab. 3.11). Die ermittelten C<sub>T</sub>-Werte der einzelnen Proben wurden auf die C<sub>T</sub>-Werte des *housekeeping* Gens *16S* normalisiert und die Unterschiede der Genexpression der zu vergleichenden Proben als n-fache Änderung berechnet. Die Spezifität der verwendeten Primer wurde anhand von Schmelzkurven überprüft. Hierfür wurden die Proben in 0,5 °C-Schritten von 50 °C auf 95 °C erhitzt und in jedem Schritt die Fluoreszenzintensität gemessen. Bei einem reinen Amplifikat ergab sich ein einheitlicher Peak beim entsprechenden Schmelzpunkt des DNA-Fragments.

**Tab. 3.10: Reaktionsansatz zur Doppelbestimmung der Genexpression mittels quantitativer Realtime-PCR.** Zur Doppelbestimmung wurden je Probe 2 x 20 µl des Reaktionsansatzes in 96-well Reaktionsplatten pipettiert.

	Volumen (µl)
SYBR <sup>®</sup> Green qPCR Mastermix	27
H <sub>2</sub> O	20
Primer forward (20 pmol/µl)	1
Primer reverse (20 pmol/µl)	1
cDNA	1

**Tab. 3.11: Exemplarisches Realtime-PCR-Programm zur Quantifizierung der Genexpression.** Die Annealing-Temperatur, die Elongationszeit sowie Zyklenzahl wurden der zu quantifizierenden DNA entsprechend angepasst. Die Erfassung der Fluoreszenz erfolgte nach jedem Annealing/Elongations-Schritt.

	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10	1
Denaturierung	95	0,25	x 35
Annealing/	60	1	
Elongation			

### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurde das Tumorgewebe in 600 µl RIPA-Puffer homogenisiert und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Das Homogenisat wurde anschließend für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt der Tumorlysate wurde mit dem DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) nach der Methode von Lowry bestimmt (Lowry *et al.*, 1951). Hierfür wurden 5 µl eines BSA-Standards (25 - 0,1 mg/ml BSA) bzw. 5 µl der Probe in 96-well-Reaktionsplatten pipettiert und mit 10 µl Reagenz A sowie 80 µl Reagenz B versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde anschließend bei 700 nm im ELISA-Reader gemessen und die Proteinkonzentration der Proben anhand der Standardreihe berechnet. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

#### 3.3.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (1970). Dabei wurden 12,5 %-ige Trenngele sowie 5 %-ige Sammelgele verwendet (Tab. 3.12). Die Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert, bevor sie bei 120 V für 2 h im Gel nach ihrer Größe aufgetrennt wurden. Zur späteren Überprüfung des richtigen Proteingewichts wurde parallel ein Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) mit aufgetragen.

**Tab. 3.12: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele für die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE.**

	<b>Sammelgel (5 %)</b>	<b>Trenngel (12,5 %)</b>
Acrylamid/Bisacrylamid	0,83 ml	2,5 ml
Tris	1,25 ml (0,5 M, pH 6,8)	2,5 ml (1,5 M, pH 8,8)
10 % SDS	50 µl	100 µl
10 % APS	25 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

### 3.3.4 Western Blot

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte elektrophoretisch nach der Methode von Towbin *et al.* (1979). Der Protein-Transfer wurde hierfür in einer Blotkammer (Bio-Rad) mit Blotpuffer für 2 h bei 120 V und 4 °C durchgeführt und durch eine Ponceau S-Färbung überprüft. Die Membran wurde nach dem Transfer zunächst für 1 h mit 5 % BSA in 1xTBS-T bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C. Vor der einstündigen Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran insgesamt dreimal für 10 min mit 1xTBS-T gewaschen. Die Detektion von Antigenen erfolgte indirekt über die Reaktion der an den Zweitantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase mithilfe des ECL-Detektionssystems. Hierzu wurde die Membran nach dreimaligem Waschen mit 1xTBS-T für jeweils 10 min mit 600 µl des ECL-Reagenz für 5 min inkubiert und das Chemolumineszenz-Signal im Fusion FX7-Detektionssystem aufgenommen. Primäre und sekundäre Antikörper wurden in 1xTBS-T entsprechend verdünnt. Die Inkubation der Membran mit Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) für 15 min erlaubte die erneute Inkubation der Membran mit einem primären bzw. sekundären Antikörper.

### 3.3.5 Kompetitiver Enzymgekoppelter Immunabsorptionsassay (ELISA)

Die VEGF-Proteinkonzentration in Tumorlysaten (siehe Abschnitt 3.3.1) wurde mithilfe Mouse VEGF Quantikine Kits (R&D Systems) bestimmt. Die gemessene Proteinmenge wurde anschließend auf 1 µg des Gesamtproteins umgerechnet.

### 3.3.6 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Für die Visualisierung von Antigenen im Tumorgewebe wurden 5 µm-dünne Gefrierschnitte hergestellt und in eiskaltem Methanol/Aceton (Verhältnis 1:1) für 5 min bei -20 °C fixiert. Nach zweimaligem Waschen in 1xPBS-T wurde das Gewebe für 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % NGS (in 1xPBS-T) blockiert und anschließend für mindestens 2 h oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Die Detektion des gebundenen Primärantikörpers erfolgte nach zweimaligem Waschen der Gewebeschnitte in 1xPBS-T mithilfe eines Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpers (Immunfluoreszenz) oder über die Bildung eines Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (ABC) mit anschließender Entwicklung des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin (Immunhistochemie). Für immunhistochemische Färbungen wurden die Gewebeschnitte zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität nach der Fixierung für 5 min in 0,03 %-iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung inkubiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mittels 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) oder Inkubation in Hämatoxylin für 5 min. Für den Nachweis von monoklonalen

Maus-Antikörpern in Mausgewebe wurde das Mouse on Mouse (M.O.M.)-Kit (Vector Labs) nach Herstellerangaben verwendet. Die Schnitte wurden anschließend in Mounting Medium (DAKO) eingedeckelt und mithilfe eines Nikon Eclipse E1000 Mikroskopes mit entsprechendem Kamerasystem (Nikon DS-Ri1) abfotografiert. Über die Software ImageJ wurden pro Gewebeschnitt fünf Bilder ausgewertet. Eine langfristige Lagerung der Schnitte erfolgte bei 4 °C.

## 3.4 Zellbiologische Methoden

### 3.4.1 Kultivierung von Zellen

Lewis Lung Carcinoma-Zellen (LLC) und B16F10-Zellen wurden in Zellmedium (DMEM mit 10 % FCS, 1 % Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)) im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden bei 80 - 90 % Konfluität im Verhältnis 1:5 gesplittet. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und für 10 min mit 1x Trypsin bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in Zellmedium aufgenommen und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Resuspendierung des Zellpellets erfolgte die Aufteilung auf neue Zellkulturflaschen.

### 3.4.2 Kryokonservierung von Zellen

Für eine dauerhafte Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen zunächst wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben trypsiniert und durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min gesammelt. Das Zellpellet wurde anschließend in Einfriermedium (Zellmedium + 10 % DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Nach Lagerung der Zellen bei -80 °C für 24 h wurden die Kryoröhrchen zur längeren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff transferiert. Zum Auftauen wurden die Zellen schnell auf 37 °C erwärmt und zur Verdünnung des DMSO in 10 ml Zellmedium überführt. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min wurde das Medium abgesaugt, das Zellpellet resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt.

### 3.4.3 Trypanblau-Färbung und Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl und Viabilität von Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärbung der Zellen mit Trypanblau (4 %-ige Lösung) bestimmt. Bei dieser Färbung tritt der Farbstoff durch die poröse Membran toter Zellen in das Zytoplasma ein und färbt diese dunkelblau, während lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen und farblos bleiben. Für die Berechnung der Zellzahl wurden fünf Quadrate der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl} \cdot 10^4 \cdot \text{Endvolumen (ml)}$$

### 3.4.4 Durchflusszytometrische Bestimmungen

Für die Analyse von Tumoren im Durchflusszytometer wurden Einzelsuspensionen erstellt (siehe Abschnitt 3.5.7) und je Probe  $2 \times 10^6$  Zellen mit Fc-Block (1:100) für 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpers in der entsprechenden Verdünnung für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen (500 x g, 5 min) und vor der Messung in 300 - 400 µl FACS-Puffer aufgenommen. Alle Versuche wurden im Durchflusszytometer LSR II (BD Bioscience) durchgeführt und mithilfe der FACS Diva Software ausgewertet. Für die Bestimmung des Immunzellinfiltrats wurden die Zellen anhand der FSC/SSC-Darstellung auf die Lymphozytenpopulation „gated“ und 200 000 Zellen pro Messung registriert. Der Ausschluss toter Zellen erfolgte über eine 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)-Färbung kurz vor der Messung.

## 3.5 Tierexperimentelle Methoden

### 3.5.1 Tierhaltung und -zucht

Alle Mäuse wurden im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen unter kontrollierten Umweltbedingungen gehalten. Bis zu fünf Tiere lebten zusammen in Makrolon<sup>®</sup>-Filterkäfigen Typ III bei einer Umgebungstemperatur von 20 °C und einem konstanten 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus. Die Tiere erhielten pelletiertes Alleinfuttermittel und Trinkwasser *ad libitum*.

### 3.5.2 VEGF/LysM-transgenes Mausmodell

Für die vorliegenden Studien wurde ein transgenes Mausmodell verwendet. Knockout-Mäuse vom Stamm C57Bl6/J mit einer zellspezifischen Deletion von VEGF in myeloischen Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Randall Johnson (University of Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt. Die genetische Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen erfolgte mithilfe des *Cre/loxP*-Systems. In Zielmäusen ist dabei das 3. Exon des VEGF-Gens auf beiden Allelen von *loxP*-Sequenzen flankiert (*VEGF<sup>fl/fl</sup>*). Um einen myeloischen Knockout für VEGF zu generieren, wurden die homozygot-gefloxten Mäuse mit Mäusen gepaart, bei denen die Sequenz für die *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle des LysozymM (*LysM*)-Promoters steht. Der *LysM*-Promoter ist dabei spezifisch für myeloische Zellen. Die *Cre*-Rekombinase katalysiert die homologe Rekombination spezifisch an den *loxP*-Sequenzen, wodurch das gefloxtete *VEGF* ausgeschnitten wird. Dies führt zu einer Leserasterverschiebung, durch die kein funktionelles VEGF-Protein mehr aus der resultierenden mRNA gebildet werden kann. Tiere mit einer Deletion von VEGF in myeloischen Zellen wurden als *Cre*-positiv (KO) bezeichnet, Tiere ohne *Cre*-Rekombinase-Aktivität als *Cre*-negativ (WT).

### 3.5.3 Genotypisierung

Im Alter von etwa vier Wochen wurden die Mäuse abgesetzt und durch das Ausstanzen eines oder mehrerer Ohrlöcher markiert. Das Ohrgewebe wurde mit 100 µl DirectPCR<sup>®</sup>-Ear (Peglab) und 1 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt und für 5 h bei 55 °C unter leichten Schüttelbewegungen bis zur kompletten Lyse des Gewebes inkubiert. Nach Inkubation bei 85 °C für 45 min wurde die genomische DNA für die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Genotypisierungs-PCR wurde wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben mit myeloid Zell-spezifischen *Cre*-Primern durchgeführt (Tab. 3.13).

**Tab. 3.13: Einzelansatz für die PCR zur Genotypisierung.**

	Volumen (µl)
PCR-Puffer (5x)	5
NTPs	5
<i>Cre</i> -Primer forward	0,5
<i>Cre</i> -Primer reverse	0,5
H <sub>2</sub> O	15
<i>Taq</i> -Polymerase (2,5 U)	0,05

### 3.5.4 Subkutane Tumordinjektion und chemotherapeutische Behandlung

Für die subkutane Injektion von Tumorzellen wurden Lewis Lung Carcinoma- bzw. B16-F10-Zellen, wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, trypsinisiert und das Zellpellet nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min mit 1xPBS auf 100 000 Zellen pro µl verdünnt. Pro Tier wurden 100 µl (entspricht 10<sup>7</sup> Zellen) der Zellsuspension injiziert. Für die chemotherapeutische Behandlung der Tumore wurde Diamindichloridoplatin(II) (Cisplatin, CDDP) in 37 °C warmem 1xPBS gelöst und jeweils 100 µl intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die chemotherapeutische Dosis betrug pro Injektion 8 mg/kg.

### 3.5.5 Bestimmung des Tumorwachstums

Die Überwachung des Tumorwachstums erfolgte alle zwei Tage. Dabei wurden Versuchstiere, bei denen die Tumore bereits vor Versuchsende ihre maximal zulässige Größe erreichten, vorzeitig aus dem Versuch genommen. Die Tumorgröße subkutan injizierter Tumore wurde mithilfe eines Messschiebers ermittelt. Die Tiere wurden hierzu kurz in Isofluran betäubt und die Länge (A) und Breite (B) des Tumors ausgemessen. Die Berechnung des Tumolvolumens erfolgte nach folgender Formel:

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot A \cdot B^2$$



Die entsprechende Verdopplungszeit des Tumors wurde anhand der Formel

$$DT = (T - T_0) \cdot \frac{\ln(2)}{\ln(V)\ln(V_0)}$$

ermittelt, mit  $T - T_0$  als Zeitraum zwischen zwei Messungen und  $V$  bzw.  $V_0$  der gemessenen Tumervolumina.

### 3.5.6 NK-Zell-Depletion

Für die Depletion von NK-Zellen wurde den Versuchstieren nach Chemotherapie an Tag 13 und 15 jeweils 100 µg des monoklonalen Antikörpers anti-NK1.1 PK136 i.p. injiziert. Kontrollmäuse erhielten eine intraperitoneale Injektion von 100 µl 1xPBS.

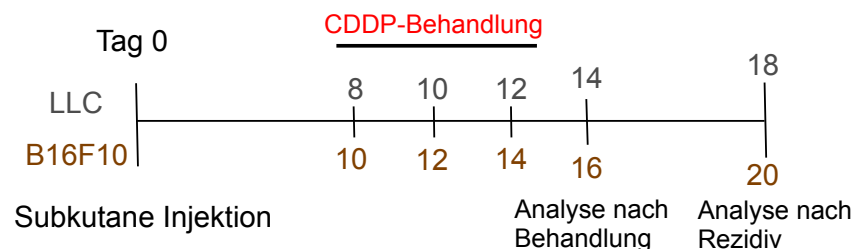
### 3.5.7 Gewebeentnahme und -verarbeitung

Alle tierexperimentellen Versuche wurden an 8-12 Wochen alten Mäusen durchgeführt. Vor der Gewebeentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Für die spätere RNA-Isolierung und Herstellung von Proteinlysaten wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur immunhistochemischen bzw. fluoreszierenden Analyse wurden die Gewebestücke in Gefriermedium (O.C.T.<sup>TM</sup> Compound) eingebettet und bei -80 °C eingefroren. Die entsprechenden Gefrierschnitte wurden in einem Kryotom angefertigt. Für durchflusszytometrische Analysen wurden die Tumore mechanisch zerkleinert und in Lysepuffer bei 37 °C für 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1100 rpm für 5 min bei 4 °C wurden das Zellpellet in 20 ml Lyse-Stop-Puffer resuspendiert und Zelltrümmer durch zweimaliges Passagieren durch ein 70 µm- und 40 µm Nylonnetz entfernt. Die Zellen wurden anschließend bei 1100 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml ACK-Puffer zur Lyse der Erythrozyten resuspendiert. Die Reaktion wurde mit 10 ml 1xPBS abgestoppt und die Zellen anschließend mit FACS-Puffer auf die entsprechende Zellzahl eingestellt. Für die Reinjektionsversuche wurden die Zellen nach Entfernung der Zelltrümmer in 75T-Zellkulturflaschen über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und am nächsten Tag in C57Bl6/J-Mäuse injiziert. Für die spätere Detektion von hypoxischen Tumorarealen wurde den Tieren 30 min vor Gewebeentnahme Pimonidazol (60 mg/kg) i.p. verabreicht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Rolle von myeloid Zell-spezifischem VEGF während der Tumorrückbildung nach Chemotherapie

Um den Einfluss von VEGF aus myeloischen Zellen auf das Tumorwachstum im Rahmen einer chemotherapeutischen Behandlung sowie die Entstehung von Tumorrezidiven nach erfolgter Behandlung zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein Mausmodell verwendet, das die spezifische Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen ermöglicht (Stockmann *et al.*, 2008). Für die durchgeführten Tumorstudien wurde das häufig verwendete und bereits publizierte Modell der subkutanen Tumorzell-Injektion gewählt, das einen Vergleich mit Ergebnissen anderer Studien erlaubt, die ebenfalls dieses Modell anwenden. Abb. 4.1 zeigt das Zeitschema, nach dem in der vorliegenden Arbeit die chemotherapeutische Behandlung der Tumore sowie anschließende Tumorentnahme zur weiteren Analyse durchgeführt wurde. Subkutan injizierte Lewis Lung Carcinoma- bzw. B16F10-Tumore wurden in einem Zwei-Tages-Rhythmus insgesamt dreimal mit 8 mg/kg Cisplatin chemotherapeutisch behandelt und die Tumore anschließend entweder zwei Tage nach der letzten Behandlung oder nach Tumorrückbildung am Ende des Versuchs entnommen.

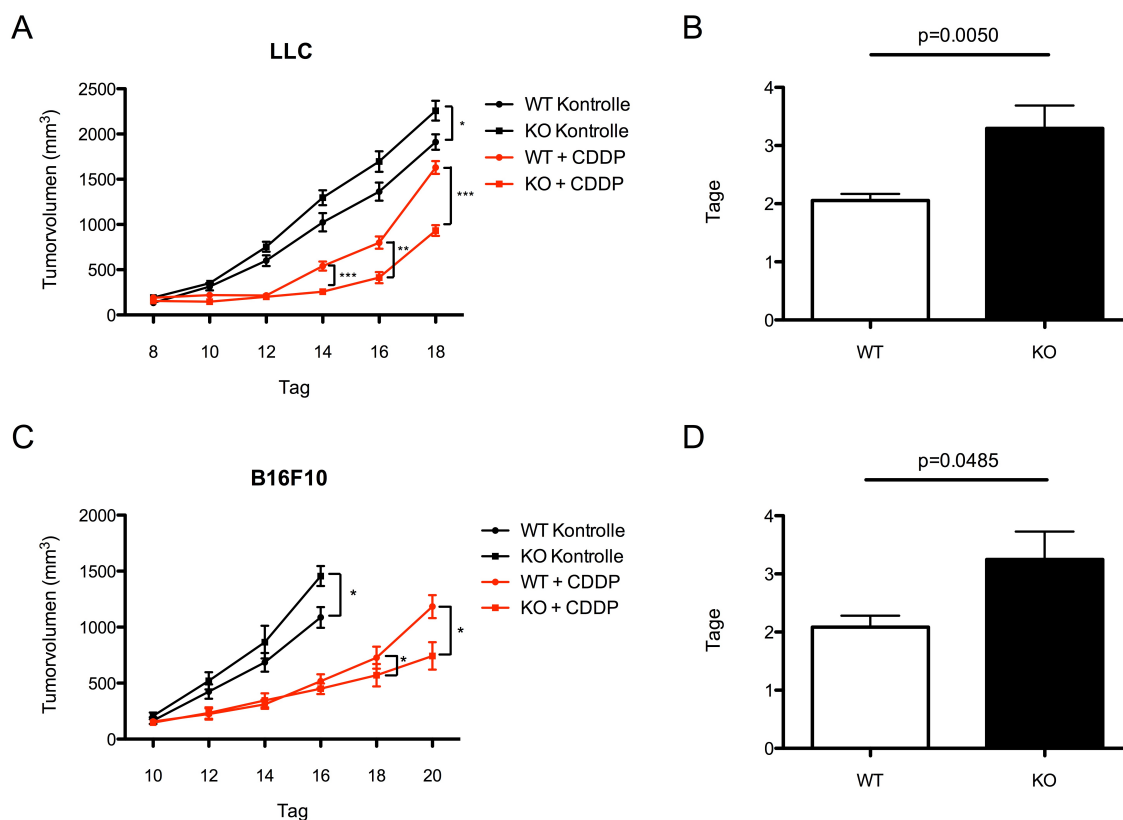


**Abb. 4.1: Behandlungsschema für implantierte Tumor-Isografts in WT und KO-Mäusen.**  $1 \times 10^7$  Lewis Lung Carcinoma- bzw. B16F10-Tumorzellen wurden subkutan in WT- und KO-Mäuse injiziert und an den angegebenen Zeitpunkten dreimal im Zwei-Tages-Rhythmus mit Cisplatin (CDDP, 8 mg/kg) behandelt. Die Tumore wurden nach Ende der Chemotherapie bzw. nach Versuchsende zur weiteren Analyse entnommen.

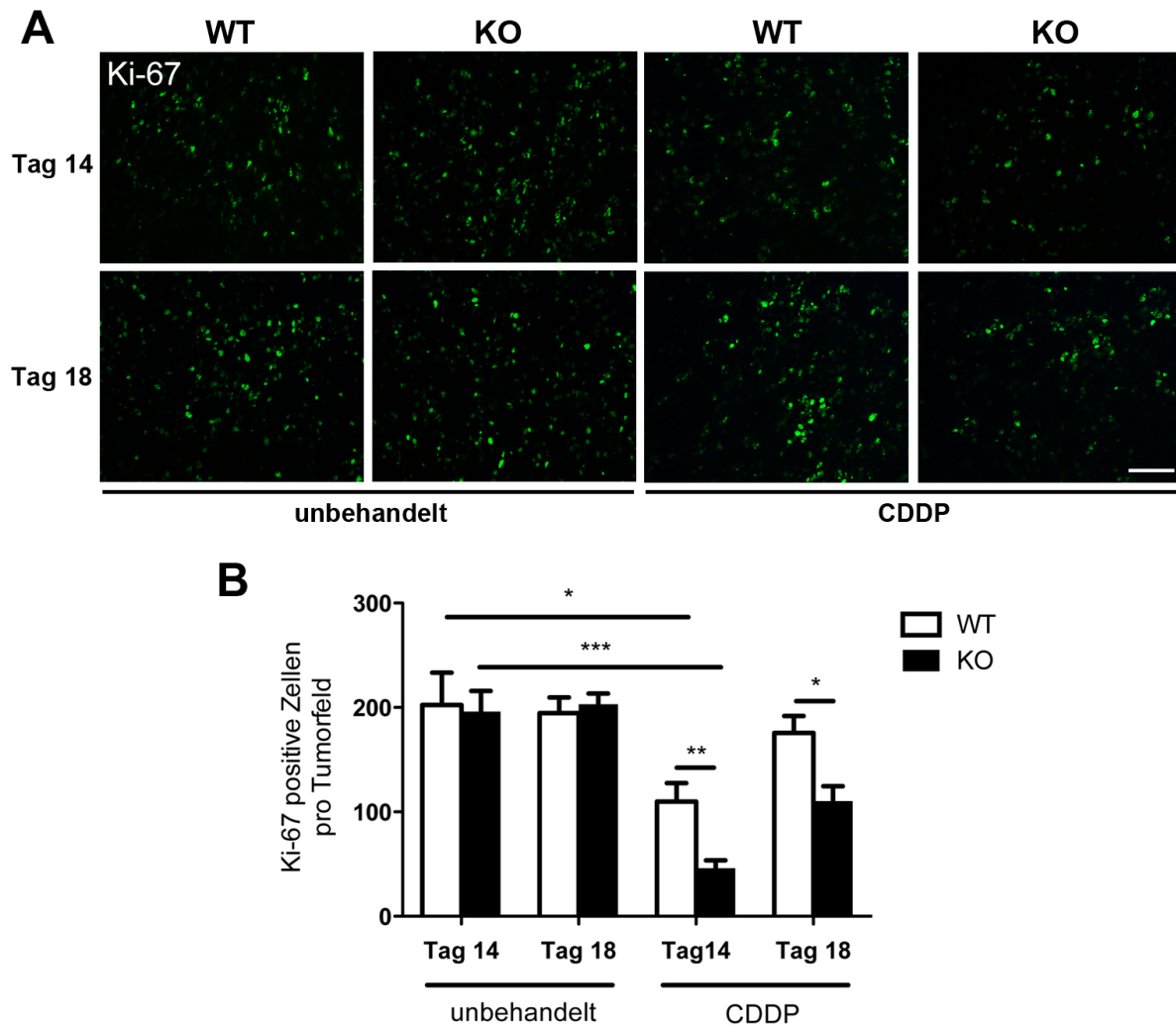
#### 4.1.1 Deletion von VEGF in myeloischen Zellen beeinflusst die Wachstumskinetik von Tumoren

Neben dem initialen Ansprechen auf therapeutische Maßnahmen spielt das Wachstumsverhalten des Tumors nach Therapieende eine entscheidende Rolle hinsichtlich einer erfolgreichen Behandlung. Um zu untersuchen, inwiefern eine spezifische Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen das Tumorwachstum nach chemotherapeutischer Behandlung beeinflusst, wurden Wachstumskurven sowie Verdopplungszeiten subkutan injizierter

LLC- bzw. B16F10-Tumorzellen in WT- und KO-Mäuse ermittelt (Abb. 4.2). Während das Tumorstadium beider Zelllinien in WT-Mäusen unmittelbar nach Beendigung der Chemotherapie wieder einsetzte, konnte in KO-Mäusen ein verzögertes Zurückwachsen der Tumore beobachtet werden. Die Tumore in den KO-Mäusen wiesen dabei eine signifikant höhere Verdopplungszeit auf, aus der ein geringeres Tumor-Endvolumen gegenüber behandelten WT-Tumoren nach Versuchsende resultierte. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte mithilfe von Fluoreszenzfärbungen für den Proliferationsmarker Ki-67 eine geringere Proliferation in Cisplatin-behandelten KO-Tumoren nachgewiesen werden (Abb. 4.3). Der Verlust von VEGF in myeloischen Zellen hat somit einen positiven Einfluss bezüglich einer verzögerten Tumorrückbildung nach Chemotherapie.



**Abb. 4.2: Wachstumskinetiken chemotherapeutisch behandelter Tumore in WT- und KO-Mäusen.** A und C: Wachstumskurven von LLC- und B16F10-Tumoren nach subkutaner Injektion. KO-Tumore weisen im Vergleich zu WT-Tumoren ein verzögertes Wachstum nach Ende der Chemotherapie auf. B und D: Längere Verdopplungszeiten von LLC- und B16F10-Tumoren in KO-Mäusen resultieren in einem geringeren Tumor-Endvolumen nach Versuchsende. LLC: WT Kontrolle, n = 9; KO Kontrolle, n = 11; WT + CDDP, n = 17; KO + CDDP, n = 17. B16F10: WT control, n = 6, Mut control, n = 6, WT + CDDP, n = 8, Mut + CDDP, n = 8. Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

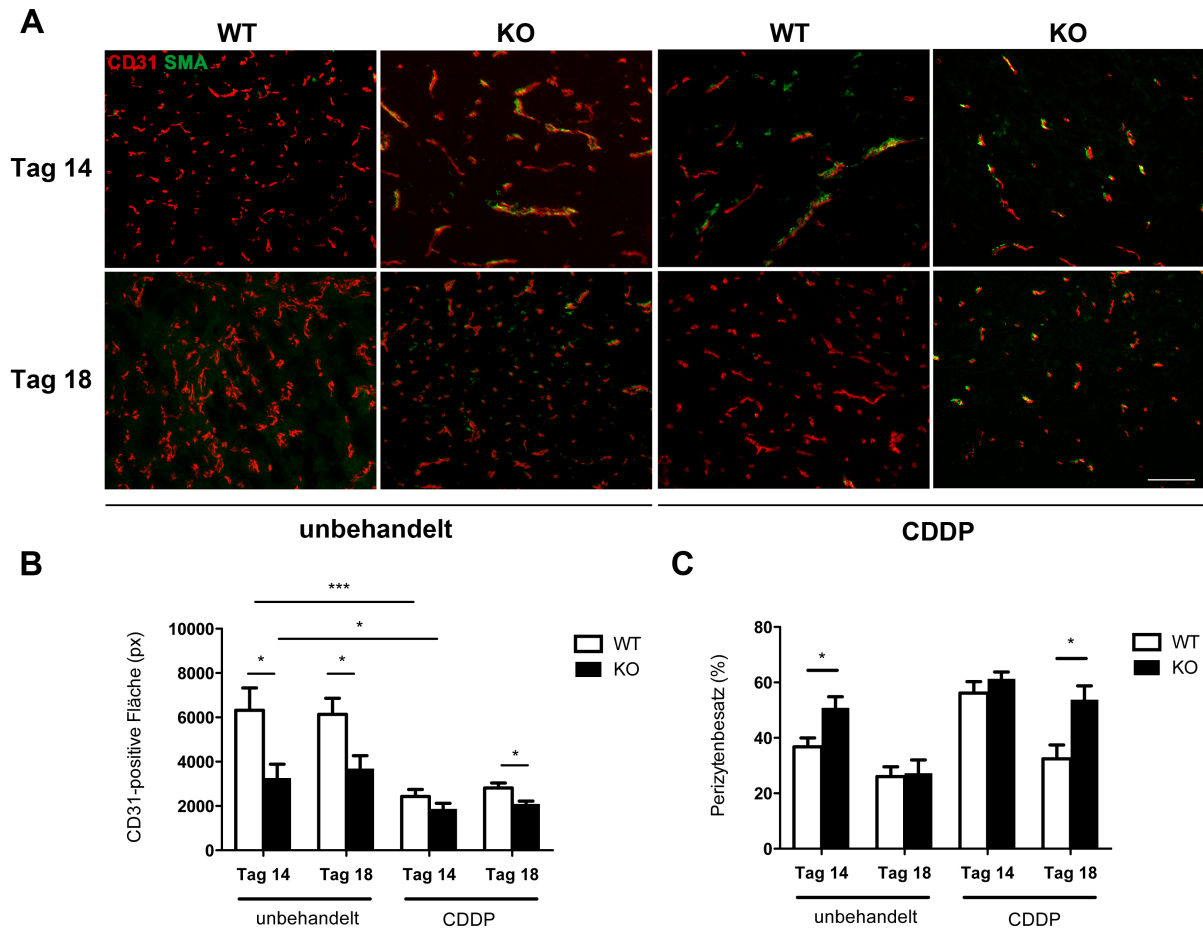


**Abb. 4.3: KO-Tumore proliferieren langsamer nach chemotherapeutischer Behandlung mit Cisplatin.** A: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder für Ki-67 zeigen weniger proliferierende Zellen nach Chemotherapie (Tag 14) und Tumorrückbildung (Tag 18) in KO-Tumoren im Vergleich zu WT-Tumoren. B: Quantifizierung Ki-67-positiver Zellen aus A. (unbehandelt,  $n \geq 3$ , CDDP,  $n \geq 5$ ). Maßstabskala entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

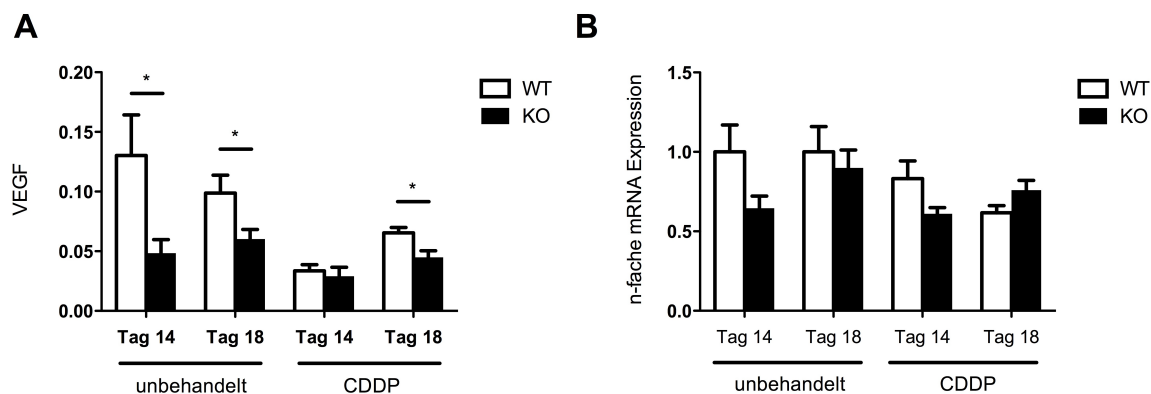
#### 4.1.2 Die Reduktion von VEGF in myeloischen Zellen führt zu einer Normalisierung tumoraler Blutgefäße

Da es sich bei dem verwendeten Mausmodell um einen myeloid Zell-spezifischen Knock-out für den Angiogenesefaktor VEGF handelt, wurde als erstes untersucht, inwiefern das Fehlen dieses angiogenen Stimulus zu einer Veränderung des Gefäßphänotyps führt und somit möglicherweise zu einem geringeren Tumorwachstum im KO-Tumor nach Behandlung mit Cisplatin beiträgt. Die Blutgefäße im Tumor zeichnen sich vor allem durch ihre unregelmäßige Struktur sowie einen geringen Perizytenbesatz aus. Infolgedessen sind die Tumorgefäße häufig undicht und es kommt zu einem diffusen Blutfluss, so dass Chemotherapeutika schlechter in den Tumor gelangen können und ihre Wirkung nicht in allen Bereichen des Tumors entfalten können. Der Erfolg einer chemotherapeutischen Behandlung ist demnach u.a. von der Durchblutung des Tumors abhängig (Jain, 2005). Um Aufschluss darüber zu erlangen, inwiefern der Verlust von VEGF in myeloischen Zellen einen möglichen Einfluss auf den vaskulären Phänotyp im Tumor nach Chemotherapie ausübt, wurde die Anzahl der Blutgefäße sowie deren Perizytenbesatz mithilfe einer Fluoreszenz-Doppelfärbung für CD31 und SMA in LLC-Tumoren aus WT- und KO-Mäusen nach der letzten Chemotherapie (Tag 14) und nach Tumorrezidiv (Tag 18) charakterisiert (Abb. 4.4). Die chemotherapeutische Behandlung mit Cisplatin bewirkte in Tumoren beider Genotypen eine signifikante Reduktion der Blutgefäße, einhergehend mit einem erhöhten Perizytenbesatz der Endothelzellen im Vergleich zu unbehandelten Tumoren. Im Verlauf der Tumorrückbildung nach Chemotherapie konnte ein leichter Anstieg der Blutgefäßanzahl im WT- und KO-Tumoren verzeichnet werden, der in WT-Tumoren jedoch signifikant höher ausfiel. Tumorgewebe aus WT-Mäusen wies nach Rezidiv im Gegensatz zu KO-Tumoren nur noch einen geringen Perizytenbesatz auf. In unbehandelten Tumoren aus KO-Mäusen konnte an Tag 14 und 18 eine geringere Blutgefäßanzahl, einhergehend mit einem signifikant höheren Perizytenbesatz an Tag 14, im Vergleich zu WT-Mäusen nachgewiesen werden.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte mittels ELISA an Tag 14 und Tag 18 eine geringere VEGF-Proteinkonzentration in unbehandelten KO-Tumoren bestimmt werden (Abb. 4.5 A). Die Chemotherapie bewirkte ein Genotyp-unabhängiges Absinken der VEGF-Konzentration, welche im Verlauf der Rückbildung der Tumore wieder anstieg, mit signifikant höherem VEGF-Level im behandelten WT-Tumor. Unterschiede bezüglich der *VEGF*-Expression auf mRNA-Ebene konnten nicht gezeigt werden (Abb. 4.5 B). Myeloische Zellen stellen demnach neben der Tumorzelle selbst eine maßgebliche VEGF-Quelle innerhalb des Tumors dar.

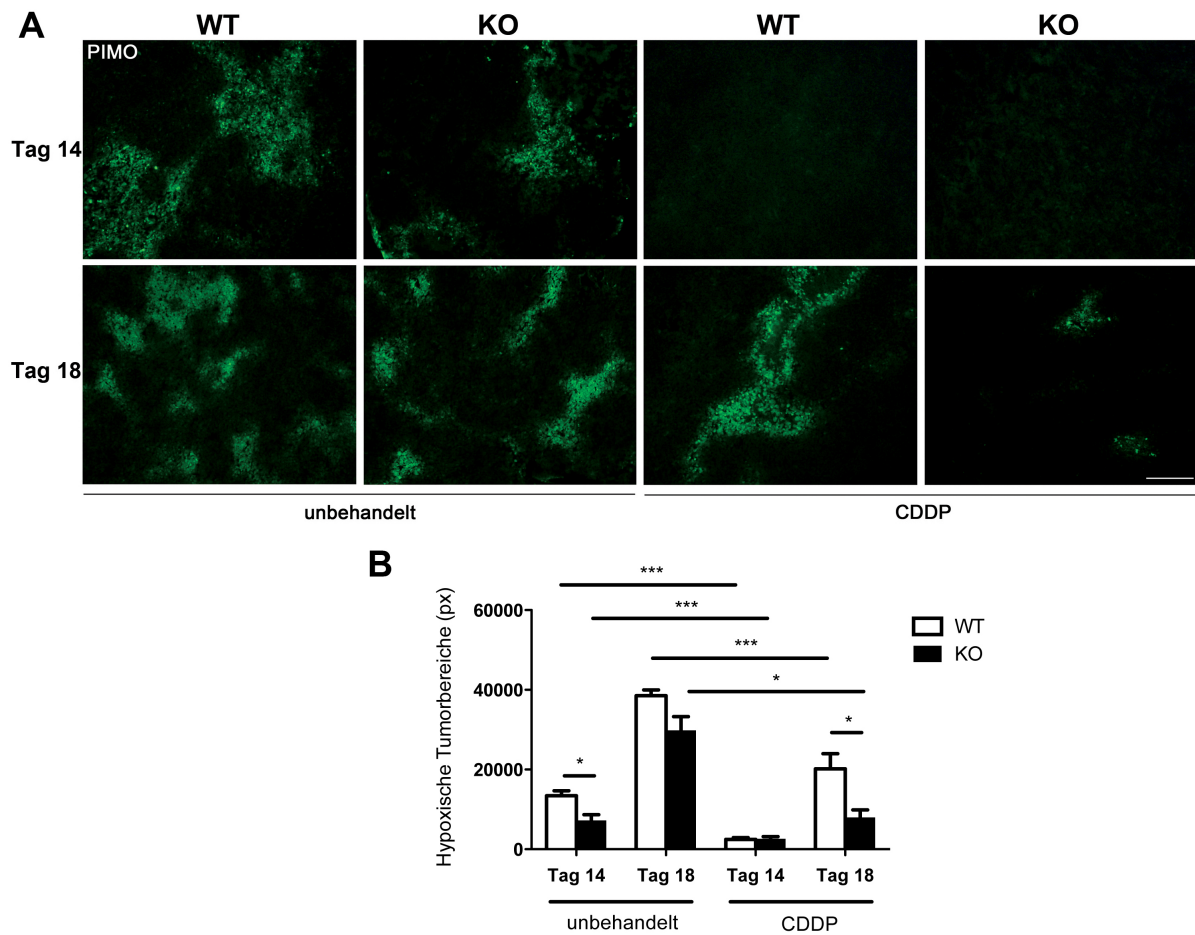


**Abb. 4.4: Verlust von myeloid Zell-spezifischem VEGF bewirkt eine Veränderung des vaskulären Phänotyps.** A: Repräsentative Doppelimmunfluoreszenzfärbungen für CD31/SMA zeigen eine Normalisierung der Blutgefäße in behandelten WT- und KO-Tumoren nach Chemotherapie und einen Wiederanstieg der Blutgefäßanzahl einhergehend mit geringerem Perizytenbesatz im WT-Tumor nach Tumorrückbildung. B: Quantifizierung CD31-positiver Blutgefäße. C: Prozentualer Anteil CD31/SMA-positiver Blutgefäße in Relation zur Gesamtzahl CD31-positiver Blutgefäße. Unbehandelt,  $n = 4$ , CDDP,  $n > 5$ . Maßstabskala entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



**Abb. 4.5: Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen hat Einfluss auf intratumorale VEGF-Proteinlevel** A: Chemotherapeutische Behandlung bewirkt in WT- und KO-Tumoren eine Reduzierung der VEGF-Konzentration (Tag 14), welche im Verlauf der Rückbildung der Tumore wieder ansteigt, mit signifikant höherem VEGF-Level im behandelten WT-Tumor (Tag 18). Unbehandelte KO-Tumore weisen zeitunabhängig ein geringeres VEGF-Proteinlevel im Vergleich zum WT auf ( $n \geq 4$ ). B: Die quantitative Bestimmung von *VEGF* auf mRNA-Ebene zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Expression (unbehandelt:  $n \geq 4$ , CDDP:  $n \geq 8$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ .

Neben der Funktionalität der Blutgefäße und der damit verbundenen Durchblutung des Tumors, die die Wirkung von Chemotherapeutika beeinflusst, ist der Erfolg einer Therapie maßgeblich von der Sauerstoffversorgung im Tumor abhängig. In Tumorbereichen mit einer Unterversorgung an Sauerstoff können Chemotherapeutika nicht ausreichend wirken, so dass diese Bereiche nur schlecht auf eine Behandlung ansprechen (Fyles *et al.*, 1998; Sasabe *et al.*, 2007). Vor diesem Hintergrund wurde die Oxygenierung von behandelten und unbehandelten Tumoren aus WT- und KO-Mäusen analysiert. Durch intraperitoneale Injektion von Pimonidazol vor Tumorentnahme können hypoxische Tumorbereiche im Nachhinein mittels Immundetektion visualisiert werden (Abb. 4.6). Tumorgewebe aus KO-Mäusen wiesen ohne Behandlung mit Cisplatin an Tag 14 eine signifikant bessere Oxygenierung auf als WT-Tumore. Im weiteren Verlauf entwickelten beide Genotypen eine massive Tumorphoxie an Tag 18. Durch zytotoxische Therapie konnte sowohl in WT- als auch in KO-Tumoren eine starke Reduktion der hypoxischen Bereiche erzielt werden, welche im Verlauf der Tumornachbildung in behandelten WT-Tumoren im Gegensatz zu KO-Tumoren wieder signifikant anstieg. KO-Tumore zeigten nach Tumorrückbildung nur eine geringe, nicht signifikante Erhöhung der Tumorphoxie im Vergleich zu Tag 14 mit signifikant geringeren hypoxischen Anteilen im Vergleich zu behandelten WT-Tumoren an Tag 18.



**Abb. 4.6: Chemotherapeutische Behandlung reduziert Tumorhypoxie in WT- und KO-Tumoren.** A: Repräsentative Darstellung hypoxischer Areale in Tumorgewebe aus WT- und KO-Mäusen. Pimonidazol wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert. Während Tumorhypoxie durch die Chemotherapie in beiden Genotypen reduziert wird (Tag 14), zeigen WT-Tumore nach Rezidiv ein erhöhtes Maß an Hypoxie verglichen mit KO-Tumorgewebe (Tag 18). B: Quantifizierung der hypoxischen Areale (unbehandelt,  $n \geq 3$ , CDDP,  $n \geq 9$ ). Maßstabskala entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



## 4.2 Der Einfluss von Chemotherapie auf die Tumorzellen und das Tumormikromilieu nach genetischer Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen

Die spezifische Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen bewirkt eine Reduzierung und gleichzeitige Normalisierung der Blutgefäße im Tumor, die sowohl in unbehandelten als auch in therapierten Tumoren für eine bessere Sauerstoffversorgung im Tumorgewebe sorgt. Wie bereits gezeigt, führt dies in KO-Mäusen ohne chemotherapeutische Behandlung zu einem schnelleren Tumorwachstum implantierter LLC-Tumorzellen (Stockmann *et al.*, 2008), welches ebenfalls für subkutan injizierte B16F10-Tumorzellen bestätigt werden konnte (Abb. 4.2). Die beschriebene Normalisierung der Blutgefäße im KO-Tumor nach Chemotherapie liefert also keine alleinige Erklärung für das verzögerte Nachwachsen der KO-Tumore nach Chemotherapie.

Es ist bekannt, dass eine Behandlung mit Cisplatin einen direkten Einfluss auf die Tumorzelle ausübt. Dabei spielt neben der Apoptose, bei der Zellen durch Induktion des Tumorsuppressorgens *p53* absterben (Barry *et al.*, 1990; Chu, 1994), die Induktion einer prämaternen Seneszenz der Tumorzelle eine wichtige Rolle (Fang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1998, 1999; Zhao *et al.*, 2004). Bei diesem Zellarrest ist die Zelle zwar weiterhin metabolisch aktiv, besitzt jedoch keine Fähigkeit mehr zu proliferieren. Seneszenten Zellen weisen dabei neben ihrer morphologischen Änderung u.a. eine erhöhte Expression Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitoren sowie eine verstärkte Aktivität der sogenannten Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase auf (Alcorta *et al.*, 1996; Kamijo *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2008). Um zu untersuchen, inwiefern eine unterschiedliche Oxygenierung in WT- und KO-Tumoren die Wirkung von Cisplatin beeinflusst und somit zu einer Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit im KO-Tumor nach zytotoxischer Behandlung beiträgt, wurde das Tumorgewebe aus WT- und KO-Mäusen hinsichtlich des Apoptose- und Seneszenzverhaltens genauer charakterisiert.

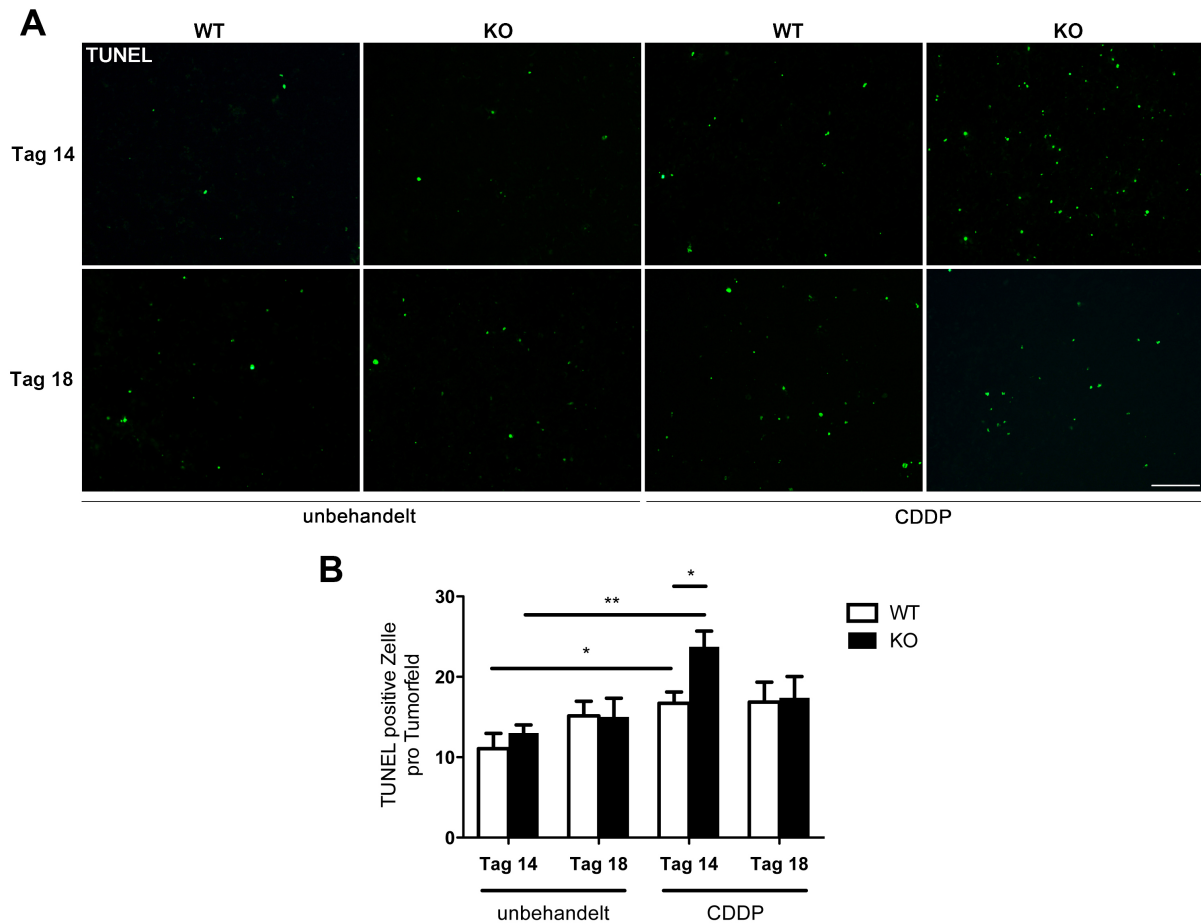
### 4.2.1 Die Deletion von myeloid Zell-spezifischem VEGF hat keinen langfristigen Effekt auf Apoptose nach zytotoxischer Behandlung

Während der Apoptose wird die DNA des Zellkerns durch die Endonuklease-Aktivität fragmentiert, wodurch Strangbrüche mit freien Hydroxygruppen entstehen. Diese können mithilfe der „*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*“ (TUNEL)-Methode visualisiert werden. Auf diese Weise wurde die Anzahl an apoptotischen Zellen in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen bestimmt. Wie anhand Abbildung Abb. 4.7 ersichtlich, bewirkte dreimalige Behandlung mit Cisplatin eine Induktion der Apoptose in LLC-Tumoren beider Genotypen, die im KO-Tumor jedoch signifikant höher ausfiel als im WT-Tumor. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten KO-Tumore nach erfolgter Behandlung

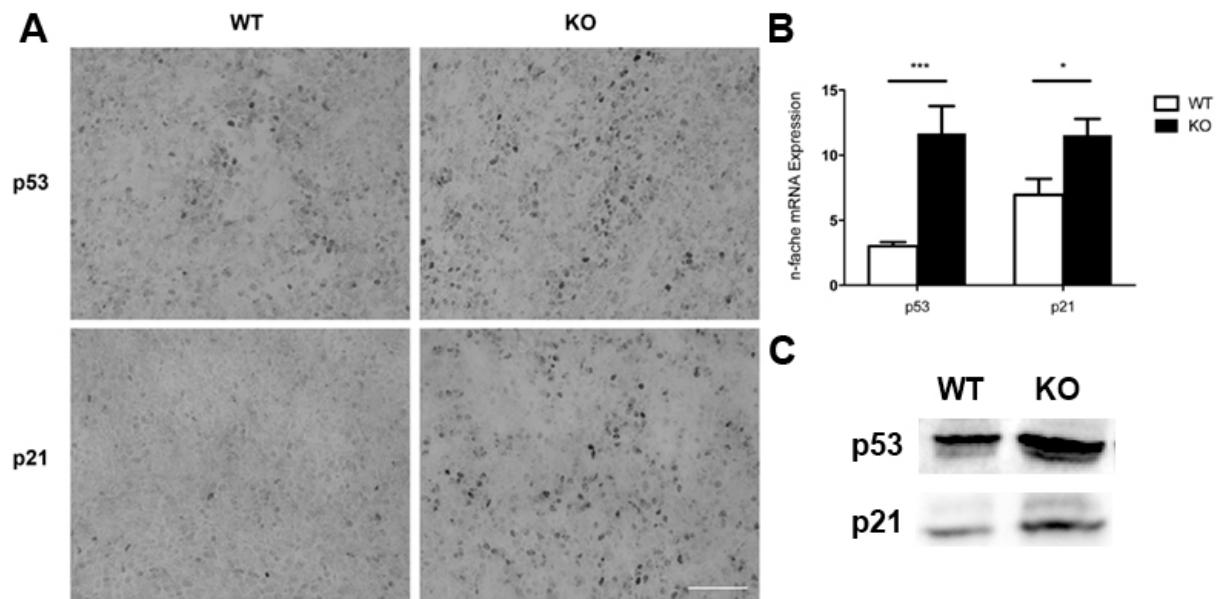
eine stärkere Gen- und Proteinexpression des Tumorsuppressorgens p53 (Abb. 4.8). Während der Tumorrückbildung in WT- und KO-Mäusen sank die Apoptoserate wieder und war vergleichbar mit unbehandelten Tumoren an Tag 14 und 18. Der durch Chemotherapie induzierte Zelltod scheint demnach nur während und direkt nach der Behandlung von Bedeutung zu sein. Es wurde bereits gezeigt, dass p53 als Transkriptionsfaktor die Expression weiterer Gene reguliert, die in Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus stehen (Shaw, 1996). Eine wichtige Rolle spielt hierbei der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p21, dessen p53-vermittelte Expression im Rahmen einer Stress-induzierten Antwort der Zelle nach DNA-Schädigung gesteigert wird und anschließend zu einem G1-Arrest der Zelle beiträgt (Aliouat-Denis *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 1999a; He *et al.*, 2005; Ravizza *et al.*, 2004). In Übereinstimmung mit der gesteigerten p53-Expression konnte eine signifikante Erhöhung von p21 auf Genexpressions- und Proteinebene in behandelten KO-Tumoren nachgewiesen werden (Abb. 4.8). Eine Hochregulierung des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21 spielt bei der Induktion eines dauerhaften Zellzyklus-Arrests der Zelle, der Seneszenz, eine wichtige Rolle und wurde diesbezüglich schon ausführlich beschrieben (Bringold & Serrano, 2000). Basierend auf dem Ergebnis, dass KO-Tumore im Zusammenhang mit einem langsameren Wachstum nach Cisplatin-Behandlung eine verstärkte Expression von p21 zeigen, wurde im nächsten Schritt näher untersucht, ob Chemotherapie neben der Apoptose auch Seneszenz in Tumorzellen induzieren kann.

#### **4.2.2 Die Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen erhöht die Chemotherapie-induzierte Seneszenz in Tumorzellen**

In seneszenten Zellen steigt der lysosomale Anteil innerhalb der Zelle und somit die Konzentration des lysosomalen Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase (Kurz *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006). Durch diese Konzentrationserhöhung kommt es zu einer Steigerung der Enzymaktivität, die dann auch vermehrt bei einem suboptimalen pH-Wert detektierbar ist. Man verwendet daher auch den Begriff der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal). Der kolorimetrische Nachweis von SA- $\beta$ -Gal erfolgt durch eine Umsetzung des Substrats X-Gal durch das Enzym bei pH = 6.0 und anschließender Oxidation des Produkts, wodurch ein tiefblauer Farbstoff in der Zelle entsteht (Dimri *et al.*, 1995). Mithilfe dieser Methode wurden subkutane Tumore, die an Tag 14 und 18 aus WT- bzw. KO-Mäusen entnommen wurden, für SA- $\beta$ -Galaktosidase gefärbt und die Anzahl positiv gefärbter Zellen ermittelt (Abb. 4.9). Unbehandelte Tumore zeigten Genotyp-unabhängig nur vereinzelt SA- $\beta$ -Galaktosidase-positiv gefärbte Zellen. Durch Chemotherapie konnte eine prämatüre Seneszenz in Tumoren beider Genotypen induziert werden. Die Anzahl seneszenten Zellen im KO-Tumor war hierbei direkt nach Behandlung an Tag 14 signifikant höher als im WT-Tumor. Nach der Tumornachbildung konnte an Tag 18 eine ausgeprägtere Seneszenz im WT-Tumor verzeichnet werden. Seneszente Zellen scheinen demnach in WT-Tumoren



**Abb. 4.7: Chemotherapie induziert stärkere Apoptose-Antwort in KO-Tumoren.** A: Repräsentative *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling* (TUNEL)-Färbung zur Detektion apoptotischer Zellen in behandelten und unbehandelten Tumoren aus WT- und KO-Mäusen an Tag 14 und 18. B: Quantitative Auswertung TUNEL-positiver Zellen (unbehandelt,  $n \geq 3$ , CDDP,  $n \geq 5$ ). Maßstabskala entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .



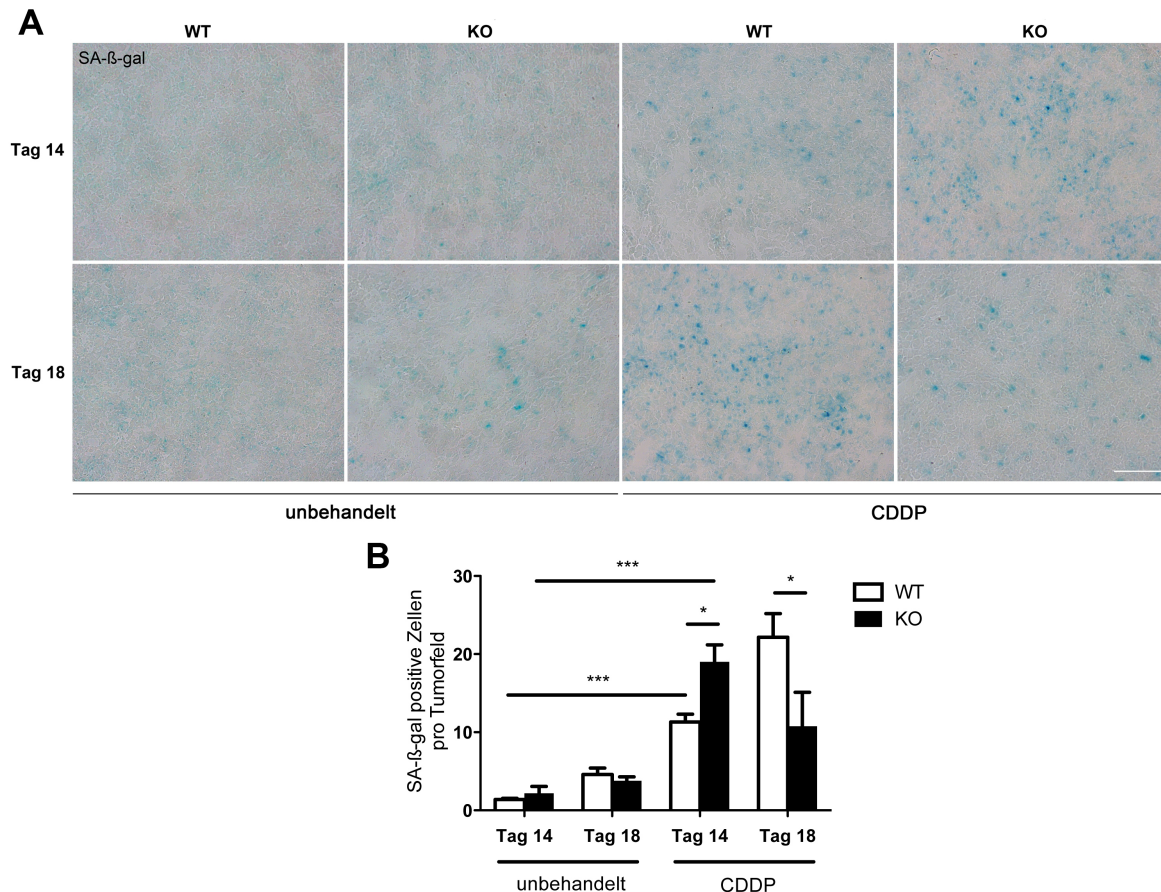
**Abb. 4.8: Chemotherapeutische Behandlung induziert verstärkte p53- und p21-Expression in KO-Tumoren.** A: Repräsentative immunhistochemische Färbung für p53 und p21 in behandelten Tumoren aus WT- und KO-Mäusen. B: *p53*- und *p21*-Genexpression in behandelten WT- und KO-Tumoren (unbehandelt,  $n \geq 4$ , CDDP,  $n \geq 10$ ). C: Repräsentativer Western Blot für die p53- und p21-Proteinexpression in behandelten WT- und KO-Tumoren. Maßstabskala entspricht 100  $\mu$ m. Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

zu akkumulieren, wohingegen Tumore aus KO-Mäusen kaum noch seneszente Zellen aufweisen. Aufgrund der geringeren Tumorgroße der KO-Tumore an Tag 18 liegt somit die Vermutung nahe, dass seneszente Zellen in KO-Tumoren bereits eliminiert wurden.

Es ist bekannt, dass seneszente Zellen ein verändertes Genexpressionsprofil besitzen, das diesen Zellen neben der Expression der bereits genannten Zellzyklus-Inhibitoren die Freisetzung verschiedener inflammatorischer und immunregulierender Faktoren sowie bestimmter Wachstumsfaktoren ermöglicht (Acosta & Gil, 2009; Coppé *et al.*, 2010; Krtolica & Campisi, 2002; Kuilman & Peeper, 2009; Xue *et al.*, 2007). Man spricht hierbei auch von einem Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP), durch den seneszente Zellen über verschiedene Mechanismen, wie z.B. Zellrezeptor-Aktivierung oder Induktion von Signaltransduktionswegen, ihre umgebenden Zellen beeinflussen können (Davalos *et al.*, 2010). Inwiefern dieser SASP im Zusammenhang mit der möglichen Eliminierung seneszenten Zellen in behandelten Tumoren steht, wurde mithilfe von Genexpressionsanalysen relevanter SASP-Marker in WT- und KO-Tumorlysaten näher untersucht. Es existiert bereits eine Vielzahl beschriebener SASP-Faktoren, die von seneszenten Zellen exprimiert bzw. sezerniert werden können (Coppé *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit gezielt SASP-Gene für Realtime-PCR-Analysen gewählt, die in der Literatur bereits mehrfach in Verbindung mit induzierbarer Seneszenz gebracht wurden.

Hierzu zählen vor allem Gene, die für verschiedene Interleukine, Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle codieren (Coppé *et al.*, 2008; Gorgoulis & Halazonetis, 2010; Xue *et al.*, 2007; Young & Narita, 2009).

In behandelten LLC-Tumoren konnte für vier SASP-Faktoren ein Anstieg der Transkriptlevel nach chemotherapeutischer Behandlung festgestellt werden (Abb. 4.10). Neben einer generellen Erhöhung der Expression der Interleukine *IL-6*, *IL-15*, des inflammatorischen Zytokins *MCP-1* sowie des Zelladhäsionsmolekül *VCAM1* in beiden Genotypen konnte dabei für alle Faktoren die höchste Transkriptmenge in behandelten KO-Tumoren gemessen werden. Die gesteigerte Expression der genannten SASP-Faktoren korreliert also mit der vermehrten Anzahl seneszenten Zellen im Tumor nach Chemotherapie. Abb. 4.11 zeigt die Expressionsdaten weiterer SASP-Faktoren, für die jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression nach chemotherapeutischer Behandlung festgestellt werden konnten.



**Abb. 4.9: Zytotoxische Behandlung induziert verstärkte Seneszenz in KO-Tumoren.**

A: Repräsentative SA-β-gal-Färbung zur Detektion seneszenten Zellen in behandelten und unbehandelten Tumoren aus WT- und KO-Mäusen an Tag 14 und 18. B: Durchschnittliche Anzahl SA-β-gal-positiver Zellen im Tumor (unbehandelt,  $n \geq 4$ , CDDP,  $n \geq 6$ ). Maßstabskala entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

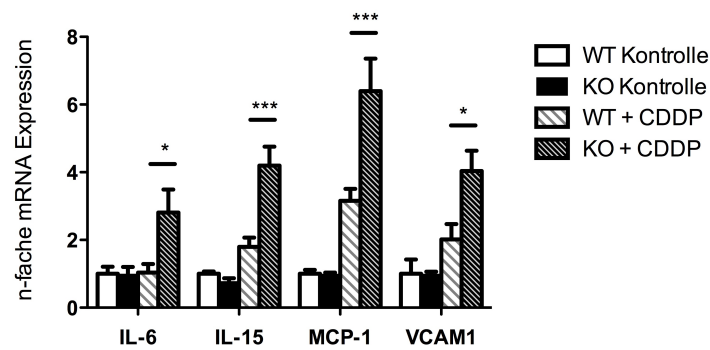


Abb. 4.10: Differentielle Expression SASP-assoziiierter Gene in WT- und KO-Tumoren nach Chemotherapie. Chemotherapeutisch behandelte KO-Tumore weisen eine signifikant höhere Expression der SASP-Marker *IL-6*, *IL-15*, *MCP-1* und *VCAM1* auf als in WT-Tumoren (unbehandelt,  $n \geq 4$ , CDDP,  $n \geq 9$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

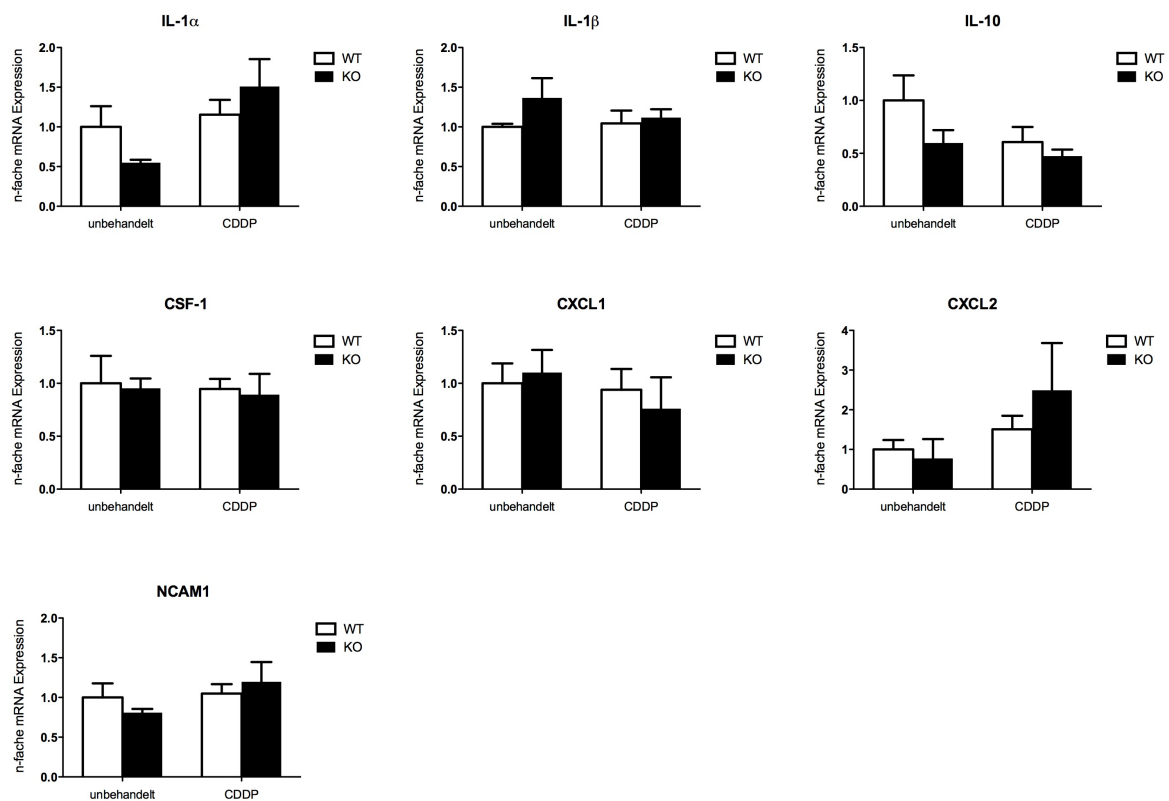


Abb. 4.11: Genexpressionsanalysen weiterer SASP-Marker zeigen keine signifikante Änderung der Transkriptlevel in WT- und KO-Tumoren nach Chemotherapie. Unbehandelt,  $n = 4$ , CDDP,  $n \geq 9$ . Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

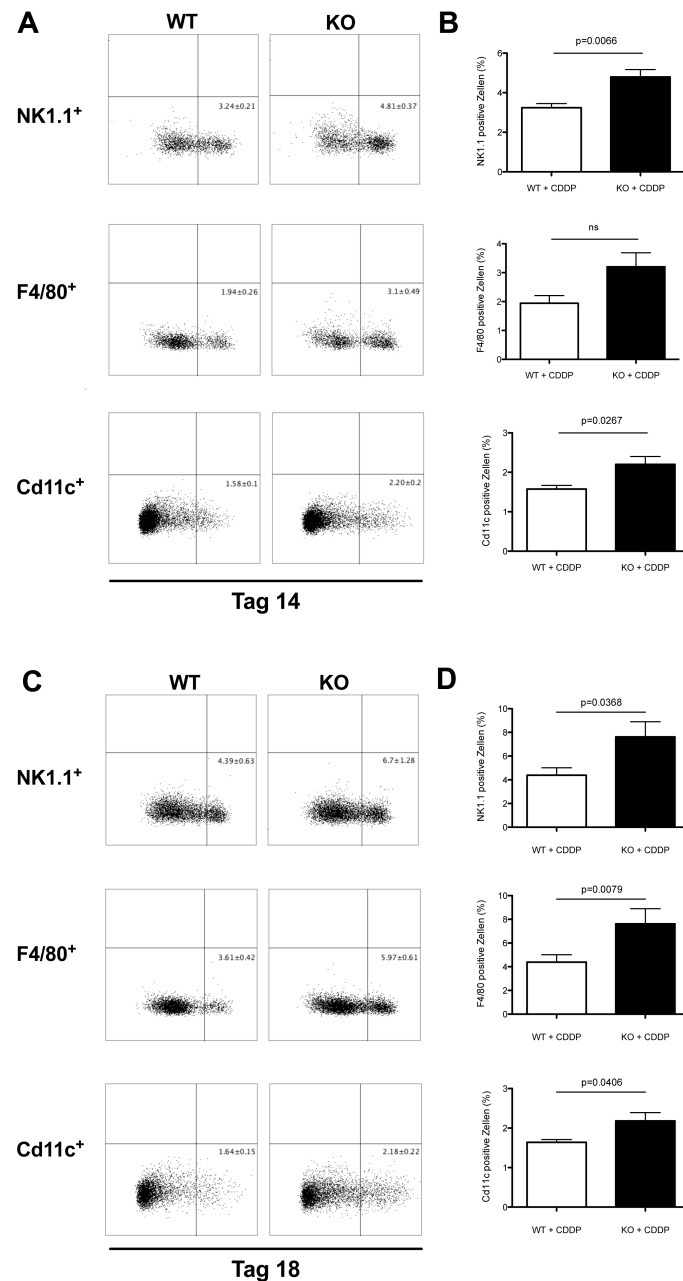
### 4.2.3 Prämatüre Seneszenz verstärkt die nicht-adaptive Immunantwort im Tumor nach VEGF-Deletion in myeloischen Zellen

Mittlerweile ist anerkannt, dass die Entstehung sowie das Wachstum von Tumoren nicht alleine auf die Eigenschaften individueller Tumorzellen zurückgeführt werden kann, sondern eine Vielzahl weiterer Faktoren des sogenannten Tumormikromilieus die Tumorentwicklung beeinflussen können (Colotta *et al.*, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011). Dieses Tumormikromilieu besteht dabei vorwiegend aus verschiedenen nicht malignen Zellen, extrazellulärer Matrix sowie löslichen Molekülen, wie z.B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren. Eine entscheidende Rolle bei der Tumorrogression wird hierbei den Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zugeteilt (Dunn *et al.*, 2004; Gasser & Raullet, 2006; Vesely *et al.*, 2011). Diese Zellen sind in der Lage, Tumorzellen zu erkennen und aktiv zu eliminieren und somit die Entstehung und Ausbreitung von Tumoren zu kontrollieren. Wie in Abschnitt 4.2.2 bereits erwähnt, lässt die beschriebene Reduktion seneszenten Zellen im KO-Tumor nach Tumorrezeidiv auf eine vermehrte Eliminierung der seneszenten Zellen schließen, die letztendlich zu einem signifikant kleineren Volumen von KO-Tumoren nach Versuchsende führt.

Senescente Zellen unterliegen einer sogenannten Überwachung des Immunsystems, das diese Zellen erkennen und eliminieren kann (Hoenicke & Zender, 2012; Kang *et al.*, 2011; Kuilman *et al.*, 2008). Die Attraktion und Rekrutierung der Immunzellen erfolgt dabei in erster Linie über die Freisetzung von Immunzell-stimulierenden Faktoren. Da im Rahmen der Genexpressionsanalysen in Abschnitt 4.2.2 vier SASP-Marker identifiziert werden konnten, die einen Einfluss auf Immunzellen ausüben, wurde im nächsten Schritt das Immunzellinfiltrat in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen analysiert und untersucht, ob die erhöhte Seneszenzinduktion zu einer verstärkten Immunzellantwort führt.

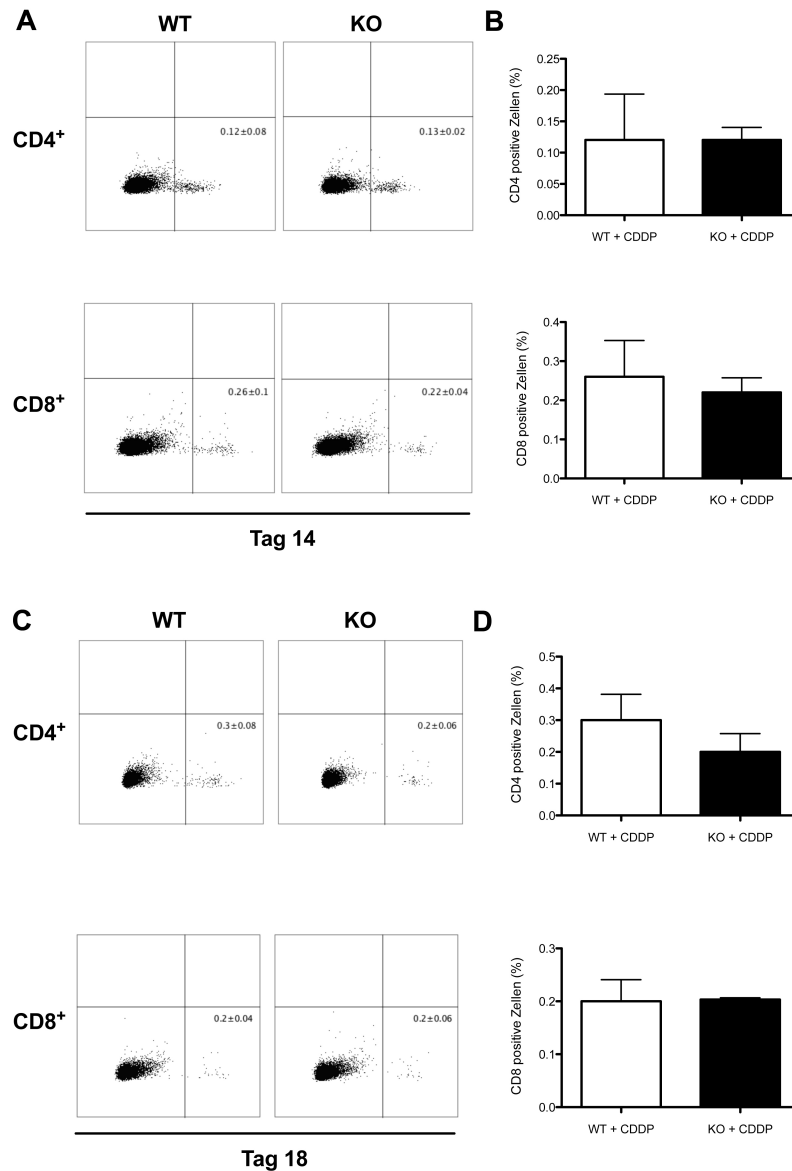
Für die Quantifizierung des Immunzellinfiltrats wurden behandelte LLC-Tumore an Tag 14 und Tag 18 aus WT- und KO-Mäusen entfernt und daraus generierte Einzelzellsuspensionen mit Fluoreszenzantikörpern gegen spezifische Immunzell-Oberflächenmarker gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde anschließend der prozentuale Anteil des entsprechenden Infiltrats bestimmt. Durch die Behandlung mit Cisplatin konnte in KO-Mäusen eine signifikant höhere Anzahl intratumoraler Makrophagen (F4/80<sup>+</sup>), dendritischer Zellen (Cd11c<sup>+</sup>) und insbesondere NK-Zellen (NK1.1<sup>+</sup>) gemessen werden, welche im Verlauf der Tumorrückbildung noch weiter anstieg (Abb. 4.12). T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) sowie zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) konnten hingegen in behandelten Tumoren beider Genotypen nur zu einem sehr geringen Prozentsatz detektiert werden (Abb. 4.13). In Übereinstimmung mit der stärkeren Immunzellinfiltration von Tumoren behandelter KO-Mäuse, konnte nach Chemotherapie in Tumorlysaten eine signifikant stärkere Expression der Interleukine *IL-12* und *IL-18* sowie des Zytokins *IFN-γ* mithilfe von Realtime-Analysen nachgewiesen werden, welche im Verlauf der Rückbildung mit Ausnahme von *IL-18* wieder

absank (Abb. 4.14). Die Immunzellen des angeborenen Immunsystems scheinen somit bei der Immunantwort nach zytotoxischer Behandlung von Lewis Lung Carcinoma-Tumoren eine übergeordnete Rolle zu spielen. Auffällig ist hierbei die hohe Anzahl infiltrierender NK-Zellen in den Tumor.

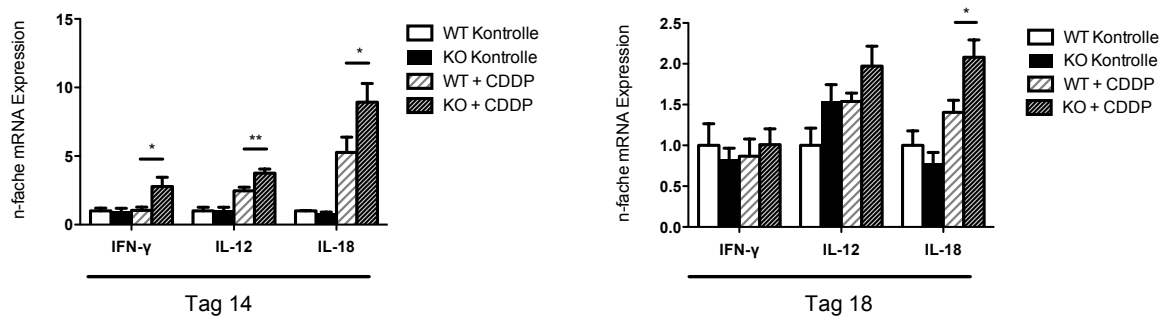


**Abb. 4.12: Immunzellen des angeborenen Immunsystems infiltrieren LLC-Tumore nach Chemotherapie.** Der Anteil positiver NK1.1-, F4/80- und Cd11c-positiver Zellen in Tumoren behandelter WT- und KO-Mäuse wurde mithilfe von Durchflusszytometrie bestimmt. A und C: Repräsentative Streudiagramme des jeweiligen Immunzell-Typs. B und D: Quantitative Auswertung der prozentualen Anteile von NK-Zellen, Makrophagen sowie dendritischen Zellen im Tumor. Das Ergebnis zeigt den Mittelwert drei unabhängig durchgeführter Versuche. Mittelwerte  $\pm$  SEM.





**Abb. 4.13:** Zellen des adaptiven Immunsystems spielen eine untergeordnete Rolle in der Immunantwort nach Chemotherapie in WT- und KO-Tumoren. Der Anteil positiver CD4-positiver T-Helferzellen und CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen in Tumoren behandelter WT- und KO-Mäuse wurde im Durchflusszytometer bestimmt. A und C: Repräsentative Streudiagramme CD4- und CD8-positiver Zellen nach Tag 14 und Tag 18 der Tumorentnahme. B und D: Quantitative Auswertung zu A bzw. C. Das Ergebnis zeigt den Mittelwert drei unabhängig durchgeführter Versuche. Mittelwerte  $\pm$  SEM.



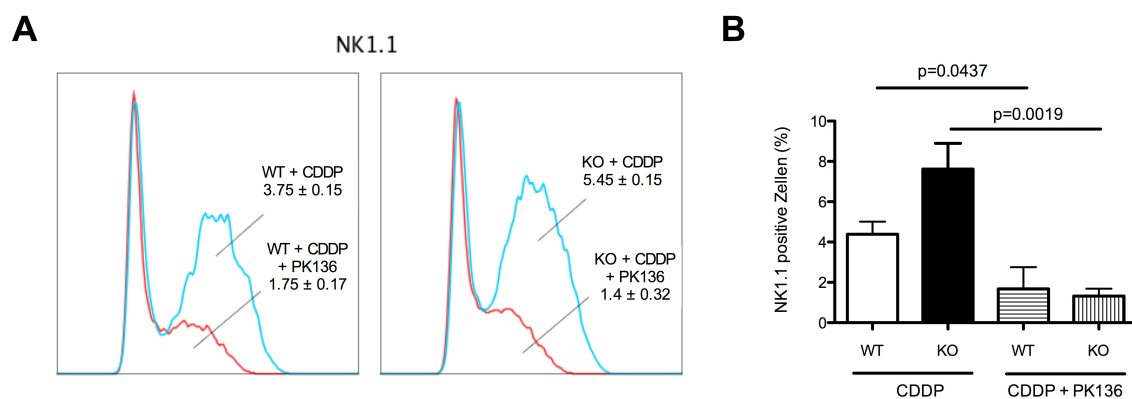
**Abb. 4.14: Immunzellspezifische Interleukine und Zytokine korrelieren mit erhöhter Immunzellantwort im KO-Tumor nach zytotoxischer Behandlung.** In Tumorlysaten aus WT- und KO-Mäusen konnte mittels Realtime-Analyse eine signifikante Steigerung der Interleukine *IL-12* und *IL-18* sowie des Zytokins *IFN- $\gamma$*  für KO-Tumore an Tag 14 verzeichnet werden. Im Laufe der Tumorrückbildung lag nur noch ein signifikant höheres Expressionslevel für *IL-18* vor (unbehandelt,  $n = 4$ , CDDP,  $n \geq 9$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

#### 4.2.4 Der Verlust von VEGF in myeloischen Zellen verstärkt die NK-Zell-abhängige Immunüberwachung seneszenten Zellen

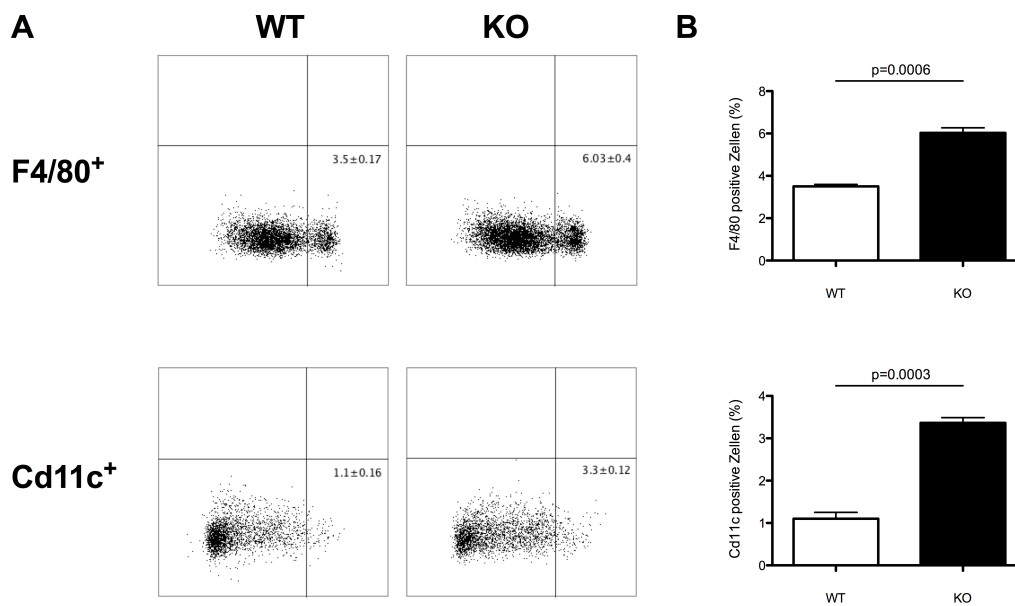
Für NK-Zellen konnte bereits früh beschrieben werden, dass sie die Fähigkeit besitzen, Tumorzellen zu erkennen und abzutöten (Herberman *et al.*, 1975; Kiessling *et al.*, 1975). NK-Zellen weisen keine Rezeptoren für spezifische Antigene auf, sondern exprimieren auf ihrer Oberfläche inhibitorische Rezeptoren, die in der Lage sind, NK-Zell-Liganden auf der Oberfläche von Zielzellen zu erkennen (Carlyle *et al.*, 2004; MacFarlane & Campbell, 2006). Eine Infizierung oder Entartung der Zelle, wie z.B. bei der Tumorzellentstehung, führt in vielen Fällen zu einer Überexpression oder Reduzierung der Liganden auf der Zelloberfläche. Diese veränderte Expression der Moleküle auf der Zielzelle wird von NK-Zellen erkannt und führt zu einer Zellkontakt vermittelten Lyse der Zelle.

Der Einfluss von NK-Zellen auf die Eliminierung seneszenten Zellen wurde bereits beschrieben (Krizhanovsky *et al.*, 2008; Sagiv *et al.*, 2012). Um die Möglichkeit der NK-Zell-abhängigen Immunantwort und die damit verbundene Reduktion seneszenten Zellen in behandelten LLC-Tumoren näher zu untersuchen, wurden NK-Zellen nach Chemotherapie durch zweimalige intraperitoneale Injektion des monoklonalen Antikörpers PK136 an Tag 13 und 15 depletiert und die Tumorgröße nach Tumorrediv bestimmt. Mithilfe durchflusszytometrischer Analysen konnte eine signifikante Reduktion intratumoraler NK-Zellen in WT- und KO-Mäusen verzeichnet werden (Abb. 4.15), wohingegen die Infiltration von Makrophagen und dendritischen Zellen unverändert blieb (Abb. 4.16). Nach der Depletion von NK-Zellen wiesen LLC-Tumore beider Genotypen nach Rückbildung des Tumors an Tag 18 keine signifikanten Größenunterschiede mehr auf. Die KO-Tumore

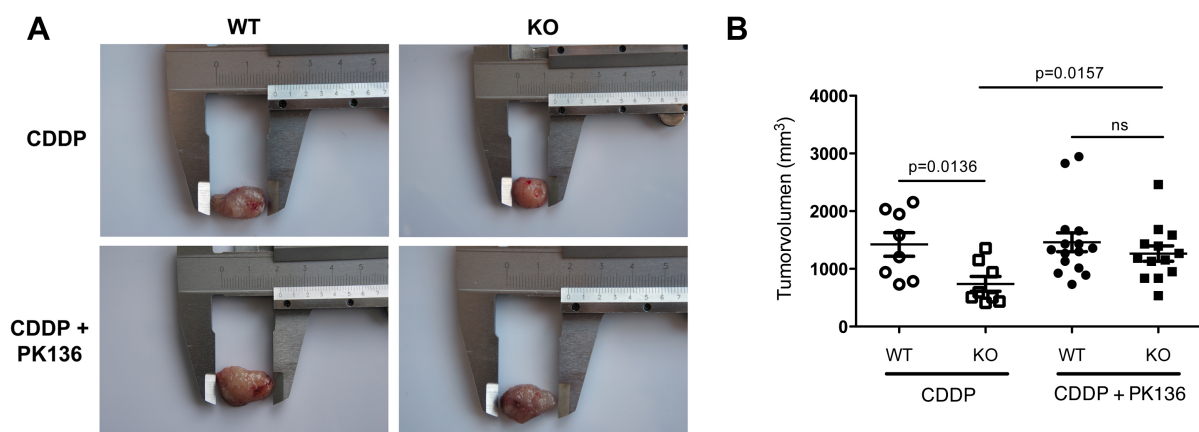
zeigten hierbei ein signifikant höheres Tumervolumen im Vergleich zu Tumoren aus KO-Mäusen, in denen NK-Zellen nicht depletiert wurden (Abb. 4.17). In Übereinstimmung mit der verminderten Anzahl an NK-Zellen im Tumor nach der Depletion ergab die Quantifizierung für *IFN- $\gamma$*  in Tumorlysaten beider Genotypen eine signifikante Reduktion der Transkriptmenge. Die Expressionslevel der Interleukine IL-12 und *IL-18* änderten sich hierbei nicht und waren vergleichbar mit den in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Daten (Abb. 4.18). Die Unterdrückung der NK-Zell-Infiltration verhinderte die Eliminierung von senszenten Zellen im KO-Tumor. Während Cisplatin-behandelte Tumore in KO-Mäusen nach Detektion der SA- $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität eine signifikant geringere Anzahl seneszenten Zellen aufwiesen, konnte dieser Effekt in NK-Zell-depletierten Tumoren aufgehoben werden. Die Tumore aus WT- und KO-Mäusen zeigten nur nach NK-Zell-Depletion eine vergleichbar hohe Anzahl seneszenten Zellen (Abb. 4.19). Das signifikant kleinere Tumervolumen nach Rezidiv in KO-Tumoren ist somit auf eine NK-Zell-abhängige Eliminierung seneszenten Zellen zurückzuführen.



**Abb. 4.15: Reduktion intratumoralen NK-Zellen nach Depletion mit monoklonalem Antikörper PK136.** Durch intraperitoneale Injektion mit PK136 (100  $\mu$ g) an Tag 13 und 15 konnte die Anzahl von NK-Zellen in WT- und KO-Tumoren signifikant gesenkt werden. A: Repäsentative Histogramme NK1.1-gefärbter WT- und KO-Tumore nach PK136- (rot) und PBS-Injektion (blau). B: Quantitative Auswertung des prozentualen Anteils NK1.1-positiver Zellen im Tumor (CDDP,  $n = 3$ , CDDP + PK136,  $n = 3$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM.



**Abb. 4.16: NK-Depletion beeinflusst nicht die Infiltration von Makrophagen und dendritischen Zellen.** Der Anteil positiver F4/80- und Cd11c-positiver Zellen in Tumoren behandelter WT- und KO-Mäuse wurde mithilfe von Durchflusszytometrie bestimmt. A: Repräsentative Streudiagramme für Makrophagen (F4/80<sup>+</sup>) und dendritische Zellen (Cd11c<sup>+</sup>) in WT- und KO-Tumoren nach NK-Zell Depletion. B: Quantitative Auswertung zu A (CDDP, n = 3, CDDP + PK136, n = 3). Mittelwerte ± SEM.



**Abb. 4.17: LLC-Tumore aus WT- und KO-Mäusen zeigen keine Größenunterschiede nach NK-Zell-Inhibierung.** Der signifikante Größenunterschied zwischen WT- und KO-Tumoren nach Zurückwachsen der Tumore wird durch die Depletion von NK-Zellen aufgehoben. A: Repräsentative Bilder für den Größenvergleich explantierter LLC-Tumore. B: Berechnete Tumorgößen für Tumore gezeigt in A (CDDP, n = 8, CDDP + PK136, n ≥ 13).

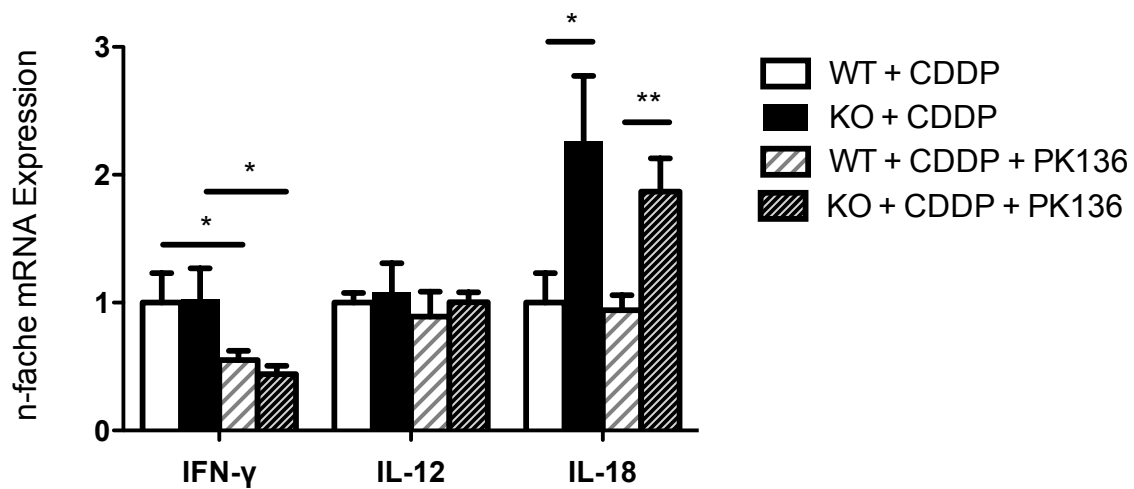


Abb. 4.18: Depletion von NK-Zellen bewirkt Reduktion von *IFN-γ* in LLC-Tumoren. Während das Expressionsmuster für die Interleukine *IL-12* und *IL-18* an Tag 18 unverändert bleibt, sinkt die Transkriptmenge des Zytokins *IFN-γ* nach NK-Zell-Depletion. Gezeigt ist die n-fache Expression (CDDP,  $n = 6$ , CDDP + PK136,  $n \geq 9$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

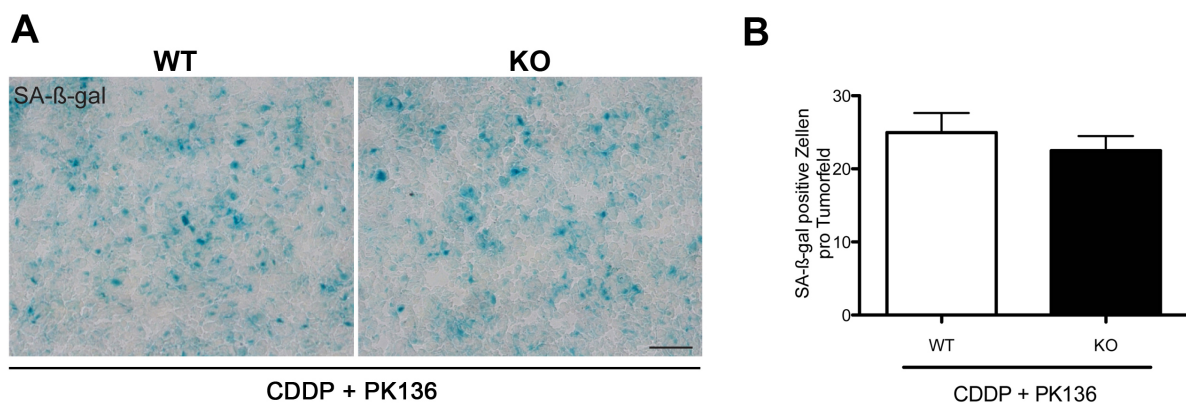
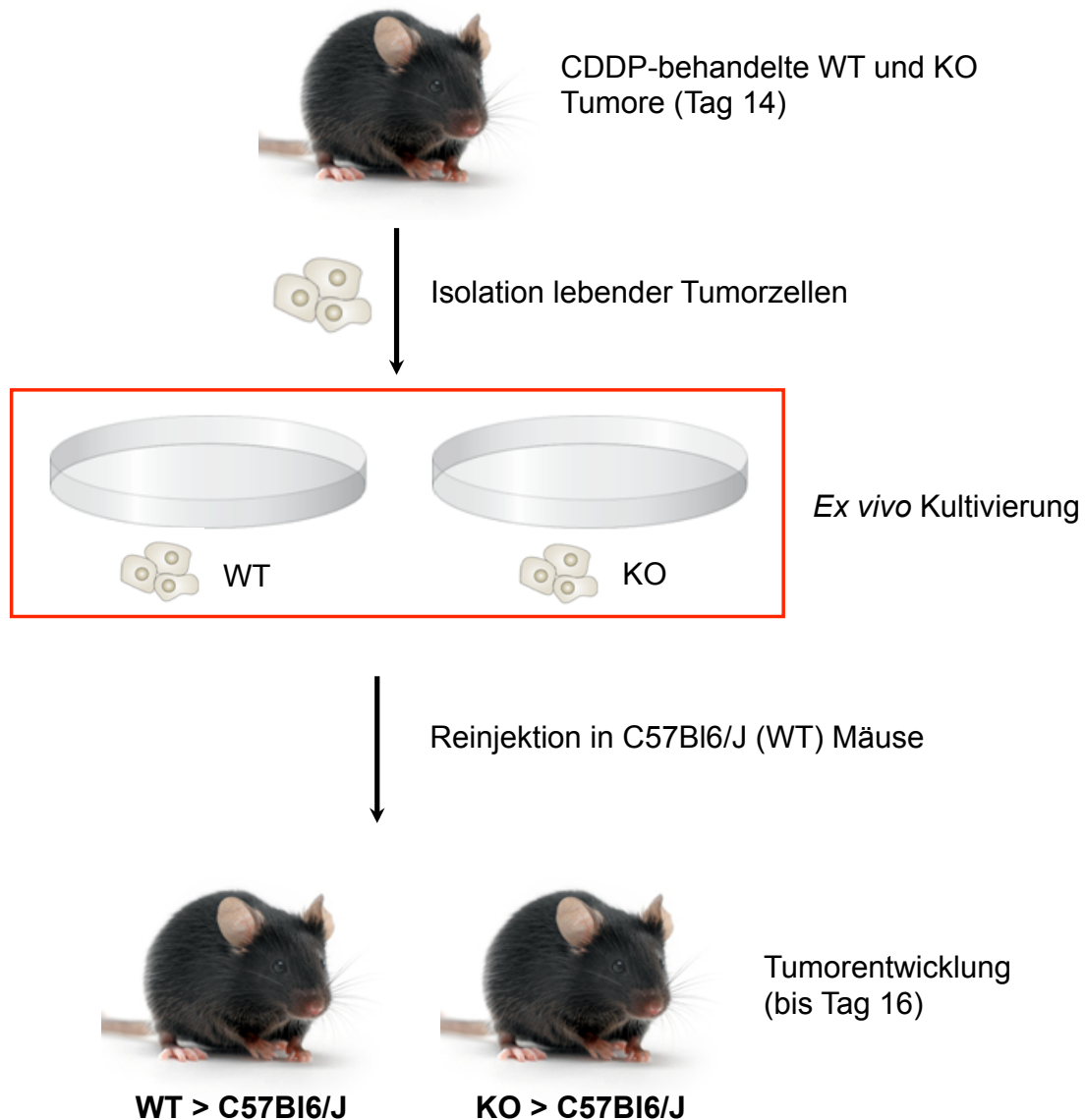


Abb. 4.19: Die Elimination seneszenten Zellen in LLC-Tumoren ist abhängig von NK-Zellen. A: Repräsentative Bilder für SA-β-Galaktosidase-Färbungen in Tumorgewebe aus WT- und KO-Mäusen nach Depletion von NK-Zellen. B: Durchschnittliche Anzahl SA-β-gal-positiver Zellen pro Tumor (WT,  $n = 6$ , KO,  $n = 6$ ). Maßstabskala entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

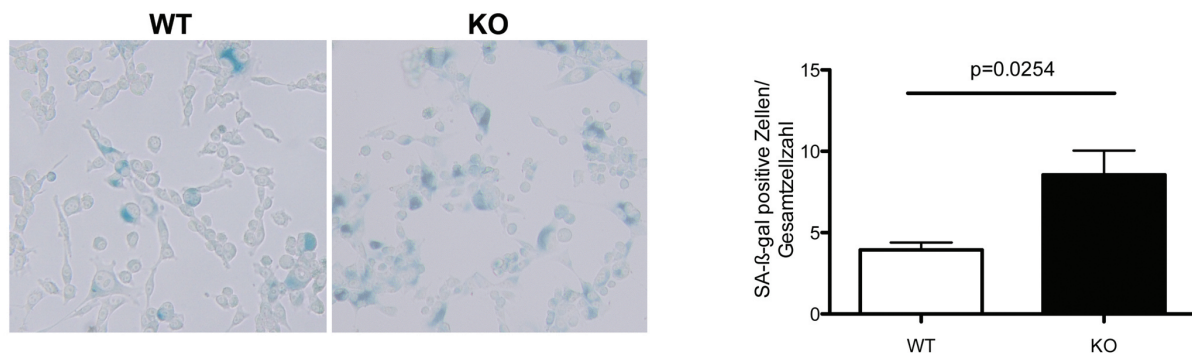
### 4.3 Verzögertes Tumorwachstum nach Chemotherapie ist abhängig von einer Tumorzell-intrinsischen Seneszenzantwort

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass durch die Deletion von VEGF in myeloischen Zellen eine Normalisierung der intratumoralen Blutgefäße eintritt, die bedingt durch eine bessere Oxygenierung des Tumors zu einer verstärkten Stressantwort der Tumorzelle nach Chemotherapie führt. Neben der Apoptose im Tumor spielt hierbei insbesondere die Induktion der Seneszenz eine wichtige Rolle, durch die im weiteren Verlauf eine erhöhte Immunzell-Rekrutierung des angeborenen Immunsystems ausgelöst wird, die zu einer NK-Zell-abhängigen Eliminierung der Tumorzellen und letztendlich zu einem reduzierten Tumolvolumen in KO-Mäusen führt. Es spielen somit Tumorzell-spezifische Eigenschaften als auch Faktoren des zellulären Tumorumfeldes eine wichtige Funktion bei der Tumorrückbildung nach chemotherapeutischer Behandlung. Um zu untersuchen, ob die verstärkte Seneszenzantwort und damit das langsamere Tumorwachstum nach Chemotherapie in KO-Mäusen auf zellinterne Eigenschaften der Tumorzelle zurückzuführen ist oder in erster Linie durch die Genotyp-spezifischen Unterschiede im Tumormikromilieu hervorgerufen wird, wurde ein Mausmodell entwickelt, mit dem ein möglicher nachhaltiger Einfluss behandelter WT- und KO-Tumorzellen auf ein Genotyp-unabhängiges Tumorumfeld untersucht werden kann (Abb. 4.20). Lewis Lung Carcinoma-Zellen wurden hierzu subkutan in WT- und KO-Mäuse injiziert und dreimal mit 8 mg/kg Cisplatin an Tag 8, 10 und 12 behandelt, bevor die Tumore an Tag 14 entnommen und daraus generierte Einzelzellsuspensionen für 24 Stunden *ex vivo* kultiviert wurden. Anschließend erfolgte die subkutane Reinjektion der explantierten Tumorzellen in naive C57Bl6/J-Mäuse. Die Tumore wurden dann nach Erreichen ihrer maximal zulässigen Größe an Tag 16 zur weiteren Analyse wieder entnommen und analysiert.

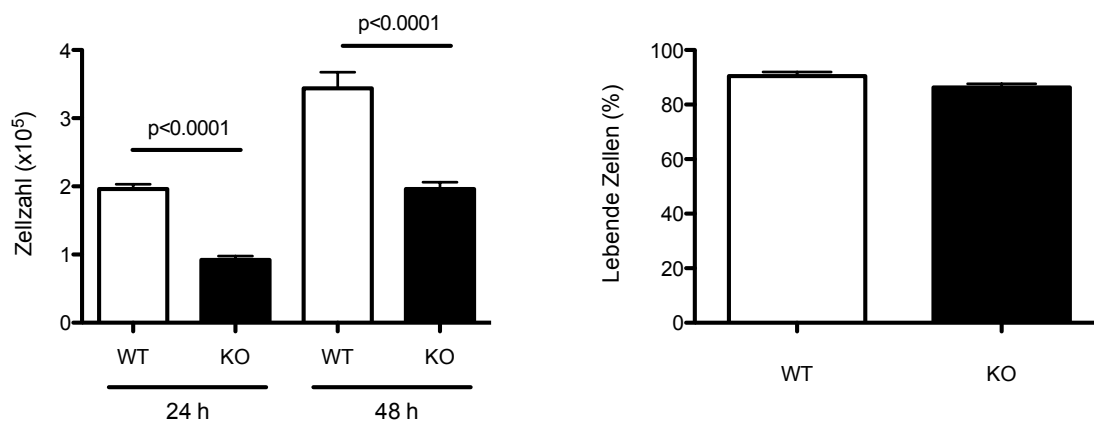
In Abschnitt 4.2.2 konnte für LLC-Tumore in KO-Mäusen bereits eine verstärkte Anzahl seneszenten Zellen einhergehend mit einer höheren Expressionsrate der SASP-Marker *IL-6*, *IL-15*, *MCP-1* sowie *VCAM1* im Vergleich zu WT-Tumoren nach Chemotherapie nachgewiesen werden. Um die Tumorzellen vor der beschriebenen Reinjektion hinsichtlich ihrer Seneszenzeigenschaften *ex vivo* näher zu charakterisieren, wurden diese für SA- $\beta$ -Galaktosidase gefärbt. Wie aus Abb. 4.21 ersichtlich, blieb die signifikant höhere Seneszenzrate der Tumorzellen aus KO-Tieren nach Explantation *ex vivo* erhalten. Übereinstimmend mit dieser erhöhten Seneszenz, zeigten KO > C57Bl6/J-Tumore eine geringere Proliferation nach 24 und 48 Stunden (Abb. 4.22) sowie eine erhöhte, wenn auch nicht signifikante Expression der bereits beschriebenen SASP-Marker *IL-6*, *MCP-1* und *VCAM1* (Abb. 4.23).



**Abb. 4.20: Mausmodell zur Untersuchung Tumorzell-intrinsischer Einflüsse auf die Tumorrückbildung nach Chemotherapie.** Tumore aus Cisplatin-behandelten WT- bzw. KO-Mäusen wurden an Tag 14 explantiert und Einzelzellsuspensionen generiert. Die Tumorzellen wurden über Nacht *ex vivo* kultiviert und  $10^7$  Zellen in in naive C57Bl6/J-Mäuse subkutan reinjiziert. Die Tumoranalyse erfolgte an Tag 16. Die Mäuse wurden entsprechend der Herkunft des Tumor aus dem ursprünglichen Genotyp mit WT > C57Bl6/J (Tumor aus WT-Maus in C57Bl6/J-Maus) bzw. KO > C57Bl6/J (Tumor aus KO-Maus in C57Bl6/J-Maus) bezeichnet.

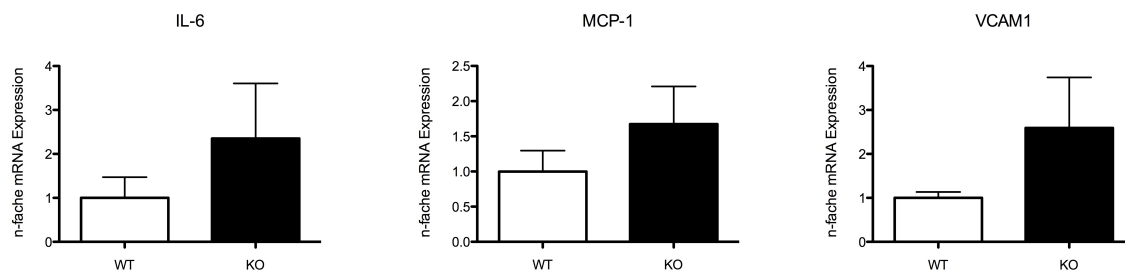


**Abb. 4.21: Explantierte Tumore aus KO-Mäusen weisen ein höheres Seneszenzverhalten unter *ex vivo*-Konditionen auf.** A: Repräsentative Bilder für die Expression von SA-β-Galaktosidase in explantierten LLC-Tumoren nach Behandlung mit Cisplatin. Die Tumore wurden an Tag 14 explantiert und nach 24 Stunden in 6-well-Reaktionsplatten für SA-β-Galaktosidase gefärbt. B: Das Verhältnis positiv gefärbter Zellen zur Gesamtzellzahl wurde für fünf zufällig gewählte Bereiche pro Tumor berechnet (WT,  $n = 4$ , KO,  $n = 4$ ).



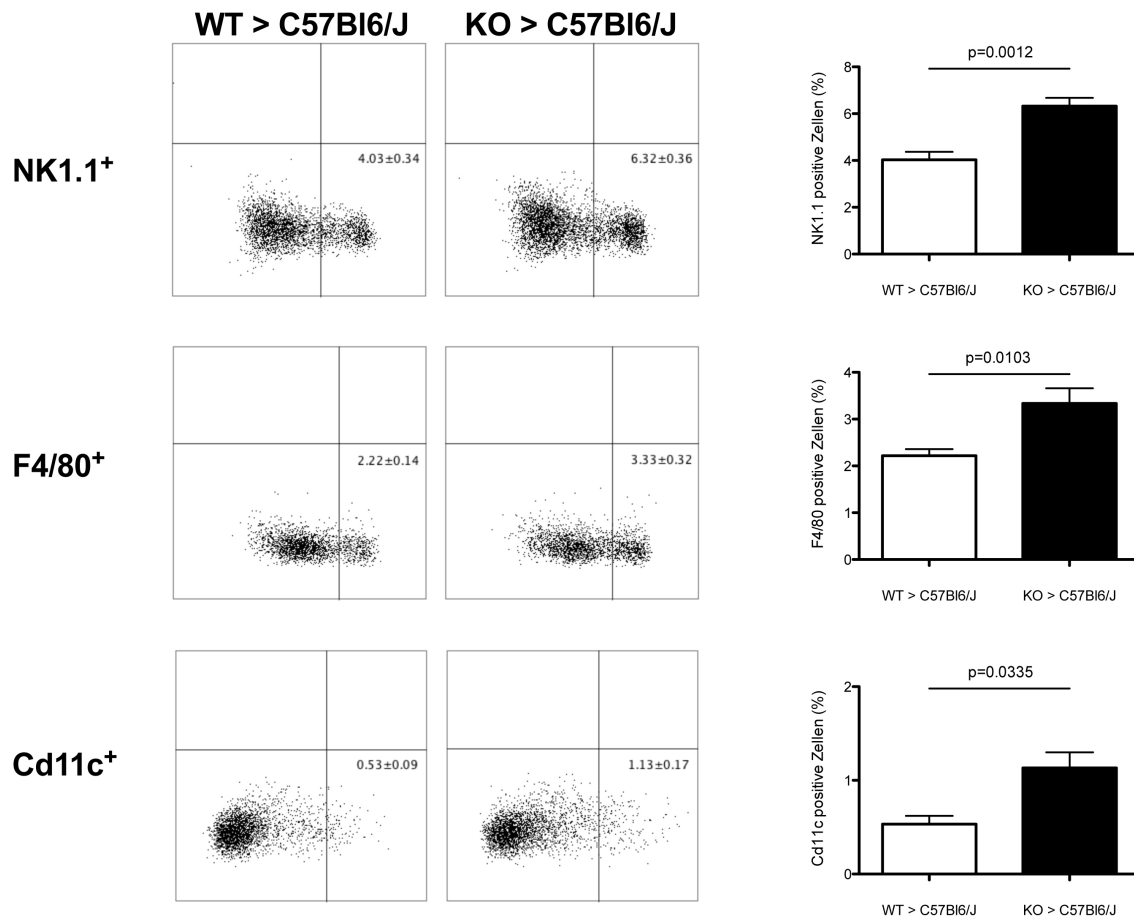
**Abb. 4.22: Proliferationsrate von explantierten WT- und KO-Tumoren nach Chemotherapie.** A: Tumorzellen aus WT- und KO-Mäusen wurden in 6-well-Reaktionsplatten ausplattiert und 24 und 48 Stunden nach Tumorentnahme mit Trypanblau gefärbt und gezählt. Der Anteil lebender Zellen war dabei in Tumoren beider Genotypen fast identisch und wurde über das Verhältnis Trypanblau-negativ zu Trypanblau-positiv gefärbter Zellen berechnet (B). (WT,  $n = 4$ , KO,  $n = 4$ ).



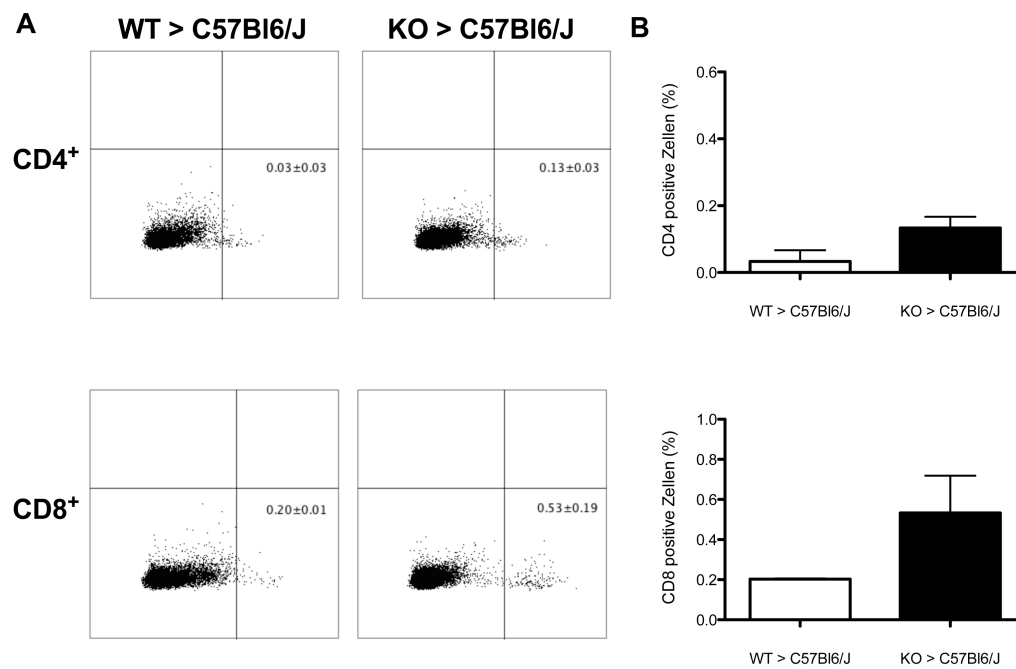


**Abb. 4.23: Die verstärkte Expression von SASP-Markern bleibt in explantierten KO-Tumoren erhalten.** Gezeigt ist die n-fache Expressionsänderung des entsprechenden SASP-Markers in KO-Tumorzellen gegenüber Tumorzellen aus WT-Mäusen (WT, n = 7, KO, n = 7).

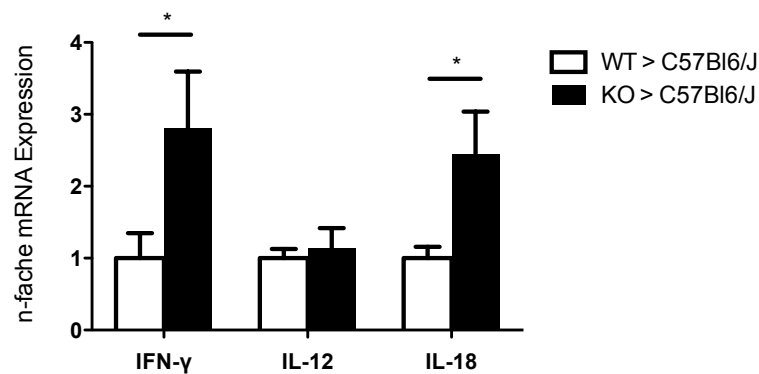
Der Seneszenzcharakter sowie das entsprechende Expressionsmuster für die genannten SASP-Marker bleiben somit in explantierten Tumorzellen außerhalb der Genotyp-spezifischen Umgebung bestehen. Inwiefern dies einen Einfluss auf das Tumorstadium und Tumorumfeld nach Reinjektion der Tumorzellen in einen neuen Wirt (naïve C57Bl6/J-Mäuse) ausübt, wurde im weiteren Verlauf näher analysiert. Hierzu wurden die Tumore zunächst aus WT > C57Bl6/J- und KO > C57Bl6/J-Mäusen an Tag 16 entnommen und daraus generierte Tumorzell-Suspensionen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern für spezifische Immunzell-Oberflächenmarker gefärbt. Der prozentuale Anteil der entsprechenden Immunzellen im Tumor wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Analog zu den in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Ergebnissen, konnte auch für die reinjizierten KO-Tumore ein signifikant höhere Anzahl an NK1.1-positiven NK-Zellen, F4/80-positiven Makrophagen sowie Cd11c-positiven dendritischen Zellen gemessen werden (Abb. 4.24). CD4-positive T-Helferzellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen wurden hingegen nur zu einem geringen Prozentsatz und ohne signifikante Unterschiede detektiert (Abb. 4.25). Mithilfe von Realtime-Analysen konnte für KO > C57Bl6/J-Tumore zudem eine signifikant höhere Expression des Zytokins *IFN- $\gamma$*  sowie Interleukins *IL-18* nachgewiesen werden, wohingegen die *IL-12*-Expression ähnlich zu den Expressionsanalysen nach Tumornachbildung unverändert blieb (Abb. 4.26).



**Abb. 4.24: Immunzellen des nicht-adaptiven Immunsystems infiltrieren stärker in KO > C57Bl6/J-Tumore.** Der prozentuale Anteil des entsprechenden Immunzell-Typs wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. A: Repräsentative Streudiagramme für NK1.1-, F4/80- und Cd11c-positive Zellen in WT > C57Bl6/J- und KO > C57Bl6/J-Tumoren. B: Quantitative Auswertung der prozentualen Anteile von NK-Zellen, Makrophagen sowie dendritischen Zellen in reinjizierten WT- und KO-Tumoren. Das Ergebnis zeigt den Mittelwert drei unabhängig durchgeführter Versuche. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

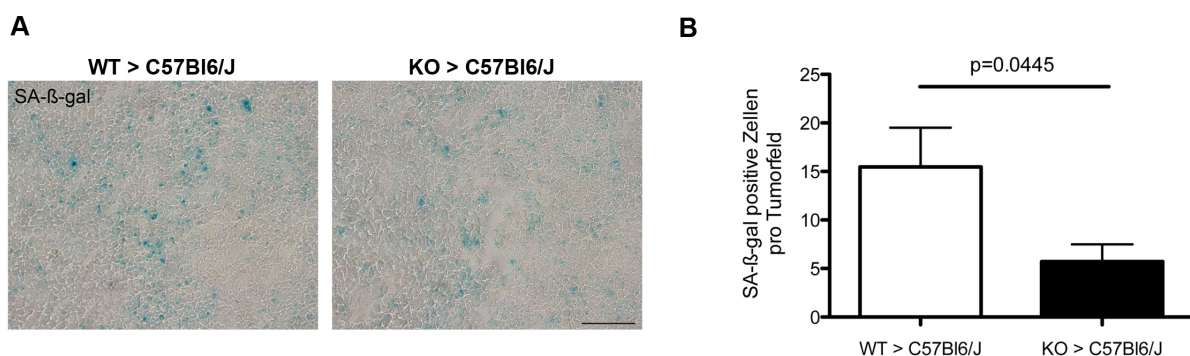


**Abb. 4.25: WT > C57Bl6/J- und KO > C57Bl6/J-Tumore zeigen eine geringe Infiltration von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen.** Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil CD4- und CD8-positiver Immunzellen bestimmt. A: Repräsentative Streudiagramme des entsprechenden Immunzell-Typs. B: Quantitative Auswertung der prozentualen Anteile von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen in reinjizierten WT- und KO-Tumoren. Das Ergebnis zeigt den Mittelwert drei unabhängig durchgeführter Versuche. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

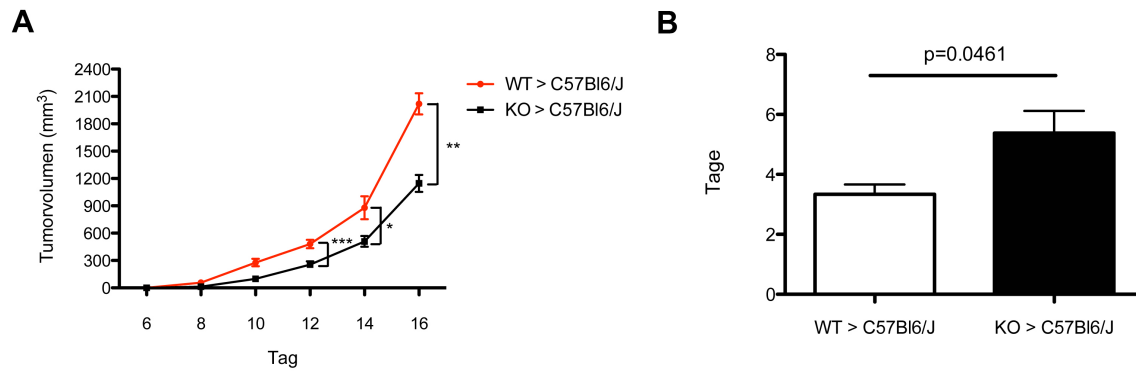


**Abb. 4.26: Immunzellspezifische Interleukine und Zytokine korrelieren mit erhöhter Immunzellantwort in KO > C57Bl6/J-Tumoren.** Mithilfe von Expressionsanalysen konnte eine verstärkte Expression von *IFN- $\gamma$*  und *IL-18* in reinjizierten KO-Tumoren nachgewiesen werden. Für *IL-12* ergab sich kein Expressionsunterschied zwischen WT > C57Bl6/J- und KO > C57Bl6/J-Tumoren (WT > C57Bl6/J, n = 10, KO > C57Bl6/J, n = 7). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*P < 0.05.

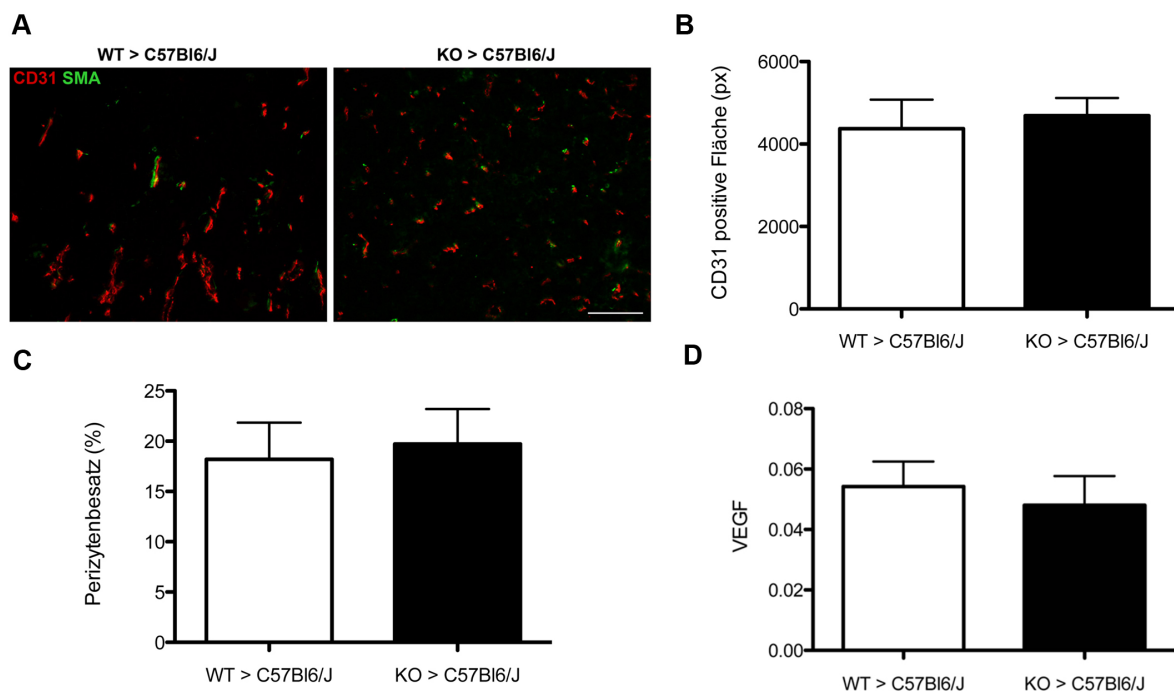
Durch die Reinjektion behandelter Tumorzellen aus WT- und KO-Mäusen in neue WT-Rezipienten konnte erneut eine verstärkte Infiltration von KO > C57Bl6/J-Tumoren durch Immunzellen erzielt werden. Wie in Abschnitt 4.2.3 gezeigt, bewirkt eine erhöhte Anzahl an Immunzellen, insbesondere NK-Zellen, eine schnellere Eliminierung seneszenten Zellen, die zu einer verzögerten Tumorrückbildung nach Chemotherapie führt. Um zu untersuchen, ob die verstärkte Immunantwort in reinjizierten KO-Tumoren ebenfalls zu einer schnelleren Eliminierung von seneszenten Zellen führt, wurde Tumorgewebe aus WT > C57Bl6/J- und KO > C57Bl6/J-Tumoren hinsichtlich des Vorhandenseins seneszenten Zellen analysiert. Reinjizierte WT- und KO-Tumore wurden hierfür an Tag 16 entnommen und die Aktivität der SA- $\beta$ -Galaktosidase in Tumorzellen mittels X-Gal-Färbung visualisiert. Die Quantifizierung ergab hierbei eine signifikant höhere Anzahl an SA- $\beta$ -Galaktosidase-positiver Zellen in WT > C57Bl6/J-Tumoren (Abb. 4.27). Darüber hinaus konnte anhand von Wachstumskurven für Tag 12, 14 und 16 ein geringeres Tumolvolumen mit signifikant höheren Tumorverdopplungszeiten in KO > C57Bl6/J-Mäusen gemessen werden (Abb. 4.28). Um sicherzustellen, dass die in dem Reinjektionsmodell ermittelten Wachstumsunterschiede der WT- und KO-Tumore nicht auf eine mögliche Veränderung des vaskulären Phänotyps zurückzuführen sind, wurden Blutgefäße sowie Perizyten in Tumorgeweben aus WT > C57Bl6/J- und KO > C57Bl6/J-Mäusen mittels CD31/SMA-Doppelimmunfluoreszenzfärbung detektiert und die Anzahl sowie der Perizytenbesatz der Blutgefäße bestimmt (Abb. 4.29). Erwartungsgemäß zeigten Tumore beider Genotypen mit vergleichbaren VEGF-Konzentrationen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Anzahl intratumoraler Blutgefäße. Darüber hinaus konnte für WT > C57Bl6/J- und KO > C57Bl6/J-Tumore nur ein geringer Perizytenbesatz nachgewiesen werden. Entsprechend dieser Ergebnisse wiesen WT- und KO-Tumore aus WT-Rezipienten nach einer Immunfluoreszenzfärbung für Pimonidazol keine Unterschiede bezüglich ihrer hypoxischen Areale auf (Abb. 4.30).



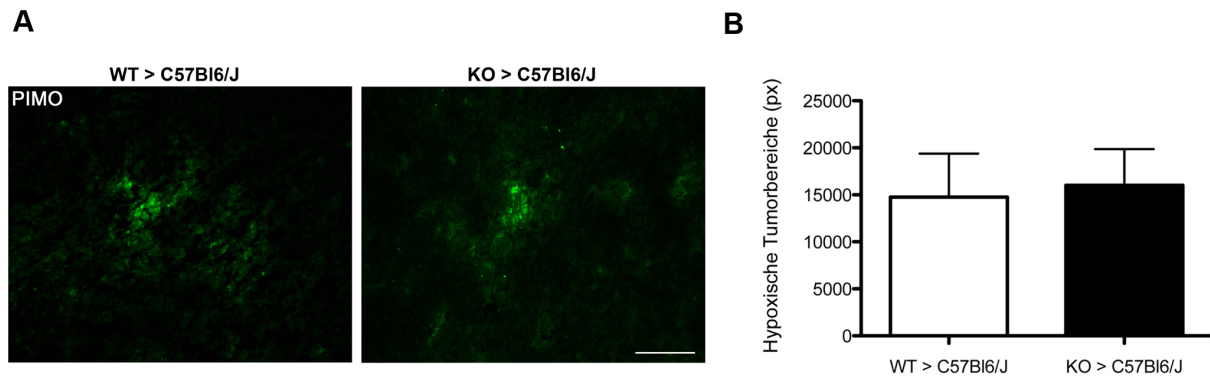
**Abb. 4.27: KO-Tumore zeigen verringerte Expression von SA- $\beta$ -Galaktosidase nach Reinjektion in naive C57Bl6/J-Mäuse.** A: Repräsentative Bilder zum Nachweis von SA- $\beta$ -Galaktosidase in WT > C57Bl6/J- und KO > C57Bl6/J-Tumoren. B: Quantitative Auswertung SA- $\beta$ -gal-positiver Zellen (WT > C57Bl6/J, n = 8, Mut > C57Bl6/J, n = 8). Mittelwerte  $\pm$  SEM.



**Abb. 4.28: Reinjizierte WT-Tumore weisen ein schnelleres Wachstum in WT-Rezipienten auf.** A: Wachstumskurven subkutan injizierter WT- und KO-Tumore in naie C57Bl6/J-Mäuse. B: Berechnete Tumorverdopplungszeiten für reinjizierte WT- und KO-Tumore (WT > C57Bl6/J, n = 14, Mut > C57Bl6/J, n = 15). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, P < 0.001.



**Abb. 4.29: Die Vaskularisierung beeinflusst nicht das Wachstum reinjizierter WT- und KO-Tumore.** A: Repräsentative Doppelimmunfluoreszenzfärbungen für CD31/SMA auf WT > C57Bl6/J- und KO > C57Bl6/J-Tumoren. B: Anzahl CD31-positiv gefärbter Blutgefäße aus A. C: Prozentualer Anteil CD31/SMA-positiver Blutgefäße in Relation zur Gesamtzahl CD31-positiver Blutgefäße. D: Durch ELISA ermittelte VEGF-Proteinkonzentration reinjizierter WT- und KO-Tumore. WT > C57Bl6/J, n = 6, KO > C57Bl6/J, n = 8. Mittelwerte  $\pm$  SEM.



**Abb. 4.30: Tumore aus WT > C57Bl6/J- und KO > C57Bl6/J-Mäusen zeigen keine Unterschiede bezüglich Tumorhypoxie.** A: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder hypoxischer Areale nach Pimonidazol-Detektion. B: Quantifizierung Pimonidazol-positiver Bereiche (WT > C57Bl6/J, n = 4, KO > C57Bl6/J, n = 3). Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 5 Diskussion

Solide Tumore bestehen nicht nur aus proliferierenden Tumorzellen, sondern bilden einen Zusammenschluss aus extrazellulärer Matrix, neoplastischen und verschiedenen stromalen Zellen, darunter mesenchymale Zellen, Immunzellen sowie Zellen des vaskulären Systems (Egeblad *et al.*, 2010). Der Tumor stellt somit ein komplexes, organähnliches Gebilde dar, in dem es zu einer Interaktion maligner Zellen mit dem Tumormikromilieu kommt, die letzten Endes das Tumorwachstum bestimmt. Ein wichtiger Prozess ist dabei die Induktion der Blutgefäßneubildung. Tumore benötigen zum Wachstum eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, deren Bedarf ab einer bestimmten Größe nicht mehr durch die Diffusion aus dem anliegenden Gewebe gedeckt werden kann. Die Unterversorgung mit Sauerstoff führt dabei zur Ausbildung hypoxischer Bereiche, in denen die Tumorzellen verstärkt angiogene Wachstumsfaktoren zur Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen und Ausbildung neuer Blutgefäße freisetzen. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) zählt dabei als endothelzellspezifisches Mitogen zu den Hauptmediatoren der Tumorangiogenese. Basierend auf der Annahme, dass die Blockade von VEGF das Gefäßwachstum und Tumorwachstum verhindert und somit das Absterben eines bereits vorhandenen Tumors bewirkt, wurden Therapien entwickelt, die auf einer Inhibierung von VEGF beruhen. Dieses klassische Konzept der sogenannten Antiangiogenese ist jedoch weit hinter den Erwartungen zurückgeblieben. So zeigen beispielsweise Mancuso *et al.* (2006), dass durch eine Therapie mit Anti-VEGF-Antikörpern die Anzahl tumoraler Blutgefäße zwar signifikant reduziert werden kann, das Absetzen der Behandlung allerdings bereits nach einem Tag zu einer Migration endothelialer Zellen entlang zurückgebliebener Basalmembranhüllen und innerhalb einer Woche zur vollständigen Revaskularisierung führt. Darüber hinaus kann eine Kombination aus Anti-VEGF-Antikörpern und konventioneller Chemotherapie zu einer Verbesserung der chemotherapeutischen Effizienz beitragen (Ferrara & Kerbel, 2005). Aufgrund einer Normalisierung der Blutgefäße können Chemotherapeutika dabei besser im Tumor verteilt werden und somit auch in Bereichen wirken, in die sie ohne antiangiogene Therapie und Gefäßnormalisierung nicht gelangen. In zahlreichen präklinischen Studien wird der Fokus einer antiangiogenen Antitumor-Therapie jedoch lediglich auf das initiale Ansprechen des Tumors während der Behandlung gelegt, so dass in den meisten Fällen das Problem der Chemoresistenz und Rezidivbildung des Tumors bestehen bleibt (Bergers & Hanahan, 2008; Broxterman *et al.*, 2003; Ebos & Kerbel, 2011; Ebos *et al.*, 2009b; Kerbel *et al.*, 2001). Mögliche Faktoren, die diesem Phänomen unterliegen, sind nur unzureichend verstanden und neue Erkenntnisse hinsichtlich einer langfristigen Tumorkontrolle deshalb dringend erforderlich. Die Rekrutierung myeloischer Zellen durch den Tumor spielt im Rahmen der Tumorprogression eine wichtige Rolle und wurde bereits als Ursache für eine Resistenz verschiedener Tumorentitäten ge-

genüber einer Anti-Angiogenese-Therapie beschrieben (Schmid & Varner, 2007; Shojaei *et al.*, 2007). Der Grund hierfür liegt u.a. in der Sezernierung von stromalem VEGF, das durch die klassischen VEGF-Inhibitoren nicht blockiert werden kann. So bewirkt die Avastin<sup>TM</sup>-Behandlung von Pankreaskarzinomen, für die bereits ein hoher Anteil von VEGF aus infiltrierenden Stromazellen nachgewiesen werden konnte, eine ineffizientere Inhibierung des Tumorwachstums im Vergleich zur Behandlung von Kolorektalkarzinomen, die vermehrt Tumorzell-spezifisches VEGF aufweisen (Liang *et al.*, 2006). Myeloische Zellen stellen somit ein potentiell therapeutisches Ziel hinsichtlich einer erfolgreichen Tumorbildung dar. So ermöglicht die Depletion myeloischer Zellen ein besseres Ansprechen von Hauttumoren auf eine strahlentherapeutische Behandlung (Ahn *et al.*, 2010). Die Inaktivierung von VAP-1, einem Adhäsionsmolekül, das die Rekrutierung myeloischer Zellen fördert, resultiert in einem langsameren Melanom- bzw. Lymphomwachstum (Marttila-Ichihara *et al.*, 2009). Die spezifische Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen führt in verschiedenen Mausmodellen zu einer Normalisierung tumoraler Blutgefäße und einem besseren Ansprechen der Tumore auf eine chemotherapeutische Behandlung (Stockmann *et al.*, 2008). Um genauere Erkenntnis darüber zu erlangen, ob der Verlust von VEGF in myeloischen Zellen in diesem Zusammenhang auch einen positiven Einfluss hinsichtlich einer langfristigen Tumorkontrolle nach Ende der Therapie ausübt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Mausmodell entwickelt, das eine Rezidivbildung und spätere Analyse subkutan applizierter Tumore in Wildtyp-Mäusen (WT) und Mäusen mit einer spezifischen Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen (KO) nach chemotherapeutischer Behandlung ermöglicht. Unsere Untersuchungen zeigten dabei, dass durch die Deletion von VEGF in myeloischen Zellen ein verspätetes Tumorrezidiv nach Chemotherapie eintritt (Abb 4.2). Die möglichen Gründe hierfür werden im Folgenden näher diskutiert.



## 5.1 Die Auswirkungen der genetischen Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen auf den Gefäßphänotyp nach Chemotherapie

Eine Vielzahl maligner Tumore zeichnet sich durch eine hohe Anzahl nicht funktionaler Blutgefäße mit hoher Permeabilität aus. Die Blutgefäßdichte ist nicht für alle Tumorentitäten ein Indikator bezüglich der Tumormalignität, dennoch korreliert eine erhöhte Anzahl tumoraler Blutgefäße oftmals mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit und einer schlechteren Prognose (Bergers & Benjamin, 2003; Bigler *et al.*, 1993; Hlatky *et al.*, 2002; Holash *et al.*, 1999; Macchiarini *et al.*, 1992; Olive *et al.*, 2009; Vartanian & Weidner, 1994). Der Gefäßphänotyp stellt somit einen wichtigen Faktor in Bezug auf die Rezidivbildung dar.

Die Deletion von myeloid Zell-spezifischem VEGF führt zu einer Normalisierung tumoraler Blutgefäße, gekennzeichnet durch eine Reduzierung der Blutgefäßanzahl mit einem gleichzeitig erhöhten Anteil an gefäßassoziierten Perizyten (Stockmann *et al.*, 2008). Wie gezeigt, kann dabei im Rahmen der zytotoxischen Behandlung mit Cisplatin unabhängig vom Genotyp eine weitere Regression tumoraler Blutgefäße erzielt werden (Abb. 4.4). Der hohe Perizytenbesatz der Blutgefäße in WT- und KO-Tumoren nach Chemotherapie verdeutlicht, dass durch die chemotherapeutische Behandlung insbesondere unreife Gefäße angegriffen werden (Abb. 4.4) und unterstützt somit die Theorie des antiangiogenen Effekts einer Chemotherapie (Browder *et al.*, 2000; Hamano *et al.*, 2004). Unbehandelte WT-Tumore weisen im Gegensatz zu KO-Tumoren eine höhere Blutgefäßdichte auf (Abb. 4.4). Die verstärkte Regression der Blutgefäße nach chemotherapeutischer Behandlung lässt jedoch vermuten, dass durch eine höhere Konzentration von myeloid Zell-spezifischem VEGF eine vermehrte Anzahl endothelialer Zellen proliferiert, die dadurch anfälliger für eine zytotoxische Schädigung sind. Die Blutgefäßdichte steigt nach Chemotherapie in WT- und KO-Tumoren wieder an, jedoch mit einer signifikant geringeren Dichte an Blutgefäßen und signifikant höherem Perizytenbesatz in KO-Tumoren (Abb. 4.4).

In Übereinstimmung mit dem beobachteten Gefäßphänotyp zeigen unbehandelte KO-Tumore in der vorliegenden Studie eine durchgängig geringere intratumorale VEGF-Konzentration. In Cisplatin-behandelten Tumoren sinkt diese Genotyp-unabhängig ab und steigt im Verlauf der Tumorrückbildung wieder an, jedoch mit signifikant geringerem VEGF-Level in KO-Tumoren (Abb. 4.5 A). Diese Ergebnisse lassen auf myeloische Zellen als Hauptquelle von intratumoralem VEGF schließen, die somit entscheidend zur Blutgefäßbildung beitragen. Der Perizytenbesatz korreliert positiv mit der Tumoroxygenierung in behandelten bzw. unbehandelten Blutgefäßen von WT- und KO-Tumoren. Während KO-Tumore vor Therapiebeginn einen erhöhten Perizytenbesatz sowie eine bessere Sauerstoffversorgung aufweisen, zeigen WT-Tumore in Verbindung mit einem geringen Anteil pe-

rizytenbesetzter Blutgefäße eine massive Hypoxie (Abb. 4.6). Die Chemotherapie bewirkt eine vergleichbare Reduzierung der Tumorphypoxie in beiden Genotypen, die sich jedoch unmittelbar nach Therapieende in WT-Tumoren wieder verstärkt ausbildet (Abb. 4.6). Tumore ohne myeloid Zell-spezifisches VEGF zeigen nach Behandlung weiterhin eine verbesserte Oxygenierung sowie einen signifikant höheren Perizytenbesatz der Tumorgefäße im Vergleich zu WT-Tumoren nach Rezidivbildung (Abb. 4.4, 4.6). Der Verlust von VEGF in myeloischen Zellen führt somit infolge einer Perizyten-vermittelten Gefäßstabilität zu einer Normalisierung tumorassoziierter Blutgefäße, durch die die Tumore eine verbesserte Sauerstoffversorgung erfahren. Die vaskuläre Normalisierung geht in den meisten Fällen mit einer Reduktion hypoxischer Tumorbereiche einher (Bock *et al.*, 2011; Goel *et al.*, 2011). Trotz weniger Studien, die belegen, dass eine antiangiogene Therapie eine entgegengesetzte Wirkung hat und in Verbindung mit Chemotherapie oder Strahlentherapie die Tumorphypoxie fördert (Fenton *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2001), ist das Prinzip der Gefäßnormalisierung mittlerweile weitreichend anerkannt und die Mehrheit klinischer Studien zeigt im Rahmen der Gefäßnormalisierung eine Verbesserung der chemotherapeutischen Effizienz (Goel *et al.*, 2011).

Die spezifische Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen zeigt einen gegenteiligen Effekt in Bezug auf das Tumorwachstum vor und nach chemotherapeutischer Behandlung. Infolge der Gefäßnormalisierung und der damit verbesserten Oxygenierung wachsen unbehandelte KO-Tumore schneller im Vergleich zu WT-Tumoren (Stockmann *et al.*, 2008), wohingegen das Fehlen von myeloid Zell-spezifischem VEGF nach erfolgter Behandlung in einem verlangsamten Wachstum resultiert (Abb. 4.2). Verschiedene Studien lassen vermuten, dass eine längere Inhibierung der VEGF/R-Signalkaskade zu einem Verlust der Gefäßnormalisierung und zur Gefäßrarifizierung führt (Ebos *et al.*, 2009a; Loges *et al.*, 2009; Pàez-Ribes *et al.*, 2009). Eine neue Studie zeigt diesbezüglich, dass durch die Behandlung mit Avastin<sup>TM</sup> bereits nach wenigen Stunden eine akute langanhaltende Perfusionsminderung in humanen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen auftritt und dabei zu einer verminderten Aufnahme und Verteilung von Chemotherapeutika führt (Van der Veldt *et al.*, 2012). Die Behandlung über ein sogenanntes therapeutisches Zeitfenster erhöht somit das Risiko der Regression und des Abbaus von Blutgefäßen und als Folge die Entwicklung hypoxischer Bereiche (Jain, 2005). Im Gegensatz hierzu hat die genetische Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen jedoch einen langanhaltenden positiven Effekt auf die Gefäßnormalisierung, die während der zytotoxischen Behandlung und darüber hinaus für eine verbesserte Oxygenierung des Tumors sorgt.

## 5.2 Der Einfluss von Chemotherapie auf die Tumorzelle in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen

Mittlerweile ist bekannt, dass das ursprüngliche Konzept der Anti-VEGF-Therapie, das eine Inhibition der Tumorangiogenese vorsieht und somit die notwendige Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen verhindern soll, als Monotherapie keine signifikante Verbesserung der Überlebensrate für den Patienten darstellt. Zwar kann die Inhibierung von VEGF auch eine direkte zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen ausüben, die selbst VEGF-Rezeptoren exprimieren und für die Tumorprogression und spätere Metastasierung auf VEGF angewiesen sind, allerdings ist dieser Effekt nur für eine geringe Anzahl verschiedener Tumorentitäten beschrieben (Akagi *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2005; Wey *et al.*, 2005). Wie eingangs erwähnt, werden antiangiogene Therapien mittlerweile bevorzugt unter der Maßgabe eingesetzt, eine Normalisierung tumoraler Blutgefäße und somit eine verbesserte Verteilung der Chemotherapeutika innerhalb des Tumors zu erreichen (Jain, 2005).

Die chemotherapeutische Behandlung löst in erster Linie einen DNA-Schaden aus, durch den in der Tumorzelle eine DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR) initiiert wird (Ciccia & Elledge, 2010). Apoptose, der programmierte Zelltod, stellt dabei in der Regel die primäre Stressantwort der Tumorzellen auf eine zytotoxische Behandlung dar und kann durch eine vaskuläre Normalisierung des Tumors im Rahmen antiangiogener Therapien gesteigert werden (Inoue *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2001). Die Deletion von VEGF in myeloischen Zellen bewirkt infolge der Gefäßnormalisierung ebenfalls ein verbessertes Ansprechen des Tumors auf Chemotherapie. Dabei zeigen behandelte Tumore eine signifikant höhere Anzahl TUNEL-positiver Zellen (Stockmann *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte neben einer vermehrten Apoptose darüber hinaus eine signifikant höhere Expression des Tumorsuppressorgens *p53* nachgewiesen werden (Abb. 4.8). Es ist bekannt, dass Cisplatin als Platinkomplex durch die Ausbildung von Inter- und Intrastrangvernetzungen der DNA die Reparaturmechanismen sowie die Telomerasenaktivität der Zelle inhibiert und somit den *p53*-abhängigen Zelltod der Zelle induziert (Barry *et al.*, 1990). Dies erklärt ein Absinken der *p53*-Expression sowie der erhöhten Apoptoserate in WT- und KO-Tumoren nach Tumorrückbildung.

Die Induktion von Seneszenz hingegen führt zu einem irreversiblen, proliferativen Arrest der Zelle und beschreibt neben der Apoptose einen zweiten Mechanismus der DNA-Stressantwort (Bartkova *et al.*, 2006; Mallette *et al.*, 2007; Micco *et al.*, 2006). Seneszenz wird infolge onkogenen Stresses vermehrt in prämaligen Tumorstadien gefunden und gilt als Barriere gegen eine maligne Tumorprogression (Bartkova *et al.*, 2005, 2006; Braig *et al.*, 2005; Collado *et al.*, 2005; Ohtani *et al.*, 2004; Sager, 1991). Verschiedene Studien belegen, dass ein dauerhafter Zellzyklus-Arrest auch infolge der zytotoxischen Schädigung

der Zelle durch Chemotherapie induziert werden kann. Man verwendet daher auch den Begriff der „Therapie-induzierten Seneszenz“, die bereits in verschiedenen Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet werden konnte (Chang *et al.*, 2002; Ewald *et al.*, 2010; Nardella *et al.*, 2011; Schmitt, 2003).

Die Induktion der Seneszenz geht u.a. mit einer gesteigerten Expression des Tumorsuppressorgens *p53* sowie des CDK-abgängigen Inhibitors *p21* einher, allerdings ist die Hochregulierung dieser Gene keine zwingende Voraussetzung für die Etablierung eines dauerhaften Zellzyklus-Arrests, was insbesondere für Tumorentitäten mit einer nachweislichen Inaktivierung bzw. Mutation von *p53* eine neue Möglichkeit der Behandlung bietet. So zeigen Tumorzellen nach Seneszenzinduktion durch Cisplatin keine Änderung der *p53*- bzw. *p21*-Expression (Wang *et al.*, 1999). Weitere Studien beschreiben die Möglichkeit, durch Chemotherapie in verschiedenen *p53*- bzw. *p21*-defizienten Zelllinien bzw. in Tumoren mit *p53*-Mutationen (Chang *et al.*, 1999a,b; te Poele *et al.*, 2002) einen dauerhaften Arrest der Zelle zu induzieren.

Die erhöhte Expression des von *p53* und *p21* in Verbindung mit einer erhöhten Aktivität der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase im Vergleich zu unbehandelten Tumoren in dieser Studie zeigt, dass durch die chemotherapeutische Behandlung mit Cisplatin eine Seneszenz in den Tumorzellen ausgelöst werden kann (Abb. 4.8, 4.9). Die Deletion von VEGF in myeloischen Zellen bewirkt dabei eine ausgeprägtere Seneszenzantwort im Tumor unmittelbar nach Therapieende im Vergleich zu behandelten WT-Tumoren. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigen behandelte KO-Tumore eine geringere Expression von Ki-67, einem Marker zur Detektion proliferierender Zellen (Abb. 4.3).

Zwei Mechanismen sind denkbar, die eine stärkere Seneszenzinduktion in KO-Tumoren begünstigen. Einerseits bewirkt der Verlust von VEGF in myeloischen Zellen zu Therapiebeginn eine verbesserte Sauerstoffversorgung im Tumor, infolgedessen Cisplatin auf eine höhere Anzahl proliferierender Tumorzellen wirkt und somit einen massiveren zytotoxischen Schaden auslösen kann. Die verstärkte DNA-Stressantwort führt dabei zu vermehrter Seneszenz. Weiterhin belegen verschiedene Studien, dass Hypoxie, wie sie vorwiegend vor Therapiebeginn in WT-Tumoren herrscht, die Induktion der Seneszenz inhibiert. So führt Hypoxie zu einer Blockierung des mTOR-Signalweges und verhindert dadurch den irreversiblen Zellarrest (Leontieva *et al.*, 2012). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie kann zudem die Induktion prämaturer Seneszenz verhindern (Welford *et al.*, 2006). Darüber hinaus demonstrieren verschiedene Studien die Reduktion Seneszenz-fördernder reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) unter hypoxischen Bedingungen (Packer & Fuehr, 1977; Parrinello *et al.*, 2003; von Zglinicki *et al.*, 1995). Diese Annahme ist jedoch umstritten, da Hypoxie in verschiedenen Studien auch als ROS-fördernd beschrieben wird (Guzy *et al.*, 2005).

Die Anzahl seneszenten Zellen in WT- und KO-Tumoren korreliert mit der Expression immunmodulierender und inflammatorischer Faktoren des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP). Die Rolle dieser Faktoren im Rahmen der Tumorentwicklung wird kontrovers diskutiert. Einige Studien weisen dem SASP eine tumorprogressive Funktion zu. Die Injektion prä-maligner Epithelzellen führt nach Stimulation mit seneszenten Fibroblasten zu einer Entwicklung maligner Tumore (Krtolica *et al.*, 2001). Die Ko-Injektion seneszenten und maligner Zellen resultiert in Mäusen in einem beschleunigten Tumorwachstum (Bhatia *et al.*, 2008; Liu & Hornsby, 2007). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Expression der Interleukine *IL-6* und *IL-8* durch aktivierte Onkogene die Angiogenese sowie das Tumorwachstum fördert (Ancrile *et al.*, 2007; Sparmann & Bar-Sagi, 2004). Im Gegensatz dazu tragen diese beiden Interleukine in seneszenten Fibroblasten zur Erhaltung der Seneszenz bei (Acosta *et al.*, 2008). Die Wirkung von SASP-Proteinen trägt somit nicht in jedem Fall zu einem malignen Tumorwachstum bei, sondern ist vielmehr kontextabhängig zu beurteilen. So sezernieren seneszente Keratinozyten den antiangiogenen Faktor Maspin (Nickoloff *et al.*, 2004), ein Tumorsuppressor-Protein, dessen verminderte Expression tumorfördernd wirkt (Jiang Shao *et al.*, 2008; Kashima *et al.*, 2008). Seneszente humane Melanozyten induzieren durch die Freisetzung von IGFBP7 die Seneszenz in weiteren nicht seneszenten Melanozyten sowie die Apoptose in verschiedenen Melanom-Zelllinien (Wajapeyee *et al.*, 2008). Für die SASP-Faktoren, die im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Erhöhung der Expression in behandelten KO-Tumoren zeigten, wird in verschiedenen Studien ebenfalls eine tumorsuppressive Wirkung beschrieben (Abb. 4.10). *IL-6* trägt zur Aufrechterhaltung der Seneszenz bei, (Kuilman *et al.*, 2008), *VCAM-1* sowie *MCP-1* regulieren die Rekrutierung und Adhäsion von Immunzellen, die den Tumor infiltrieren (Krizhanovsky *et al.*, 2008; Murdoch *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2007) und *IL-15* trägt zur Entwicklung und Homöostase von NK-Zellen bei (Ranson *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen lassen daher vermuten, dass die SASP-Faktoren auch in der vorliegenden Arbeit einen eher tumorsuppressiven Einfluss innerhalb des Tumormikromilieus ausüben.

### 5.3 Der Effekt der spezifischen Deletion von VEGF in myeloischen Zellen auf das Tumormikromilieu nach chemotherapeutischer Behandlung

Immunzellen üben als Bestandteil des Tumormikromilieus einen wichtigen Einfluss auf die Tumorentwicklung aus und besitzen dabei eine fördernde oder hemmende Wirkung auf das Tumorstadium (Dougan & Dranoff, 2009; Fridman *et al.*, 2011; Whiteside, 2006). Im Rahmen der Chemotherapie ermöglicht die genetische Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen eine verstärkte Rekrutierung von Makrophagen, dendritischen Zellen sowie Natürlichen Killerzellen (Abb. 4.12). Neben der Funktion als endothelspezifischer Wachstumsfaktor kann VEGF immunsuppressive Effekte vermitteln und dabei die Tumorstadium unterstützen. Mehrere Studien belegen, dass VEGF die Reifung dendritischer Zellen inhibiert (Gabrilovich *et al.*, 1998, 1996; Ohm *et al.*, 1999). Anti-VEGF-Therapieansätze können in diesem Zusammenhang die Funktionalität dendritischer Zellen erhöhen und somit die Tumorstadium einschränken (Gabrilovich *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2006). Darüber hinaus fördert VEGF die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen, die wiederum die T-Zell-basierte Immunantwort unterdrücken können (Hansen *et al.*, 2012; Ohm *et al.*, 1999). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit nur ein sehr geringer Anteil CD4- und CD8-positiver T-Zellen in behandelten Tumoren nachgewiesen werden, der darüber hinaus keine genotypischen Unterschiede aufwies. Ein direkter, relevanter Effekt von VEGF aus myeloischen Zellen auf T-Zellen ist somit nicht sehr wahrscheinlich. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass chemotherapeutisch behandelte KO-Tumore in Mäusen mit einer Deletion für VEGF in myeloischen Zellen nach Transplantation in naive C57Bl6/J-Mäuse, die VEGF in myeloischen Zellen exprimieren, die gleiche Immunantwort wie in ihrem Ursprungs-Host hervorrufen können. Die Chemotherapie induziert in KO-Tumoren nach Therapieende eine höhere Anzahl seneszenter Zellen als in WT-Tumoren, die gleichzeitig in einer signifikant höheren Expression der SASP-Gene *IL-6*, *IL-15*, *VCAM1* und *MCP-1* resultiert (Abb. 4.10). Insbesondere VCAM1 und MCP-1 gelten dabei als fördernde Faktoren für die Rekrutierung von Makrophagen und dendritischen Zellen und könnten somit ein Grund für die verstärkte Infiltration dieser Immunzellen in Tumore ohne myeloid Zell-spezifisches VEGF sein (Deshmane *et al.*, 2009; Simionescu, 2007). Verschiedene Studien belegen, dass die Freisetzung immunregulatorischer Faktoren durch seneszente Zellen die Immunantwort beeinflusst. So führt die p53-Restauration in Leberkarzinomzellen zu einer Seneszenzinduktion, die eine unmittelbare Eliminierung dieser Zellen durch das angeborene Immunsystem zur Folge hat und somit zur Tumorstadium beiträgt (Xue *et al.*, 2007). Die Studie beschreibt in diesem Zusammenhang eine sogenannte Seneszenzüberwachung durch das Immunsystem. Demnach sind Immunzellen in der Lage, seneszente Zellen zu erkennen und eliminieren. Dieses Prinzip ist nicht nur auf

den Tumor beschränkt, sondern wurde auch schon im Rahmen der Leberfibrose beschrieben (Krizhanovsky *et al.*, 2008). Expressionsanalysen belegen dabei, dass Lebersternzellen nach Seneszenzinduktion durch eine Leberschädigung eine Vielzahl von Genen hochregulieren, die in einer Rekrutierung von Immunzellen, insbesondere NK-Zellen, resultiert. Die NK-Zell-abhängige Eliminierung der seneszenten Zellen reduziert dabei das Ausmaß der Fibrose und die Gefahr einer späteren Zirrhose-Entwicklung. Eine Seneszenzinduktion geht allerdings nicht immer mit einer Eliminierung durch Immunzellen einher. So können beispielsweise seneszente Zellen in melanozytären Nävi dauerhaft existieren und stabil im Gewebe eingebunden sein (Michaloglou *et al.*, 2005).

Die Beobachtung, dass die initial hohe Anzahl seneszenten Zellen in KO-Tumoren nach Chemotherapie im Verlauf der Tumorrückbildung signifikant abnimmt, lässt auf einen Eliminierungsmechanismus schließen. Die Depletion von NK-Zellen, die den Hauptanteil des Immunzellinfiltrats nach Chemotherapie darstellen, führt zu einer schnelleren Tumorprogression der KO-Tumore nach Behandlung und resultiert nach Rezidiv in einem Verlust des signifikant kleineren Tumolvolumens gegenüber WT-Tumoren (Abb. 4.17). Die Akkumulation seneszenten Zellen in NK-Zell-depletierten KO-Tumoren nach Tumorrückbildung verdeutlicht somit, dass eine Eliminierung seneszenten Zellen im Wesentlichen von einer NK-Zell-vermittelten Immunüberwachung abhängt und diese neben der initialen Seneszenzinduktion die Rezidivbildung entscheidend beeinflusst.

Entscheidene Kriterien für eine Erkennung und effiziente Eliminierung von Tumorzellen sind sowohl die Anzahl als auch die Aktivierung intratumoraler NK-Zellen. Die Interleukine 12 und -18, die u.a. von Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert werden können und in KO-Tumoren nach Chemotherapie in höherer Menge vorliegen als in behandelten WT-Tumoren, besitzen eine aktivierende Funktion und fördern die IFN- $\gamma$ -Produktion in NK-Zellen (Brady *et al.*, 2010; Fogler *et al.*, 1998; Lauwerys *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 1998; Watford *et al.*, 2003). Die Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen kann dabei einen positiven Einfluss auf die Entwicklung CD4- sowie CD8-positiver T-Zellen haben, die eine weitere Antitumor-Immunantwort bewirken können (Smyth *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt trotz einer signifikanten Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Konzentration im KO-Tumor durch NK-Zellen aufgrund einer sehr geringen T-Zell-Infiltration ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 4.13, 4.14).

Die beschriebenen Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass der chemotherapeutisch induzierte SASP in seneszenten Zellen die Rekrutierung von Makrophagen und dendritischen Zellen fördert, die im Gegenzug durch eine vermehrte Sezernierung der Interleukine 12 und -18 die Infiltration sowie Aktivierung Natürlicher Killerzellen fördern, welche dann seneszente Zellen erkennen bzw. eliminieren und somit zur Tumorregression insbesondere in KO-Tumoren beitragen, die eine verstärkte Seneszenz nach Chemotherapie aufwei-

sen. Eine Rekrutierung der Immunzellen in den Tumor kann allerdings auch direkt durch Tumorzellen vermittelt werden, die keine Seneszenz aufweisen. So bewirkt die chemotherapeutische Behandlung mit Cyclophosphamid eine Regression p53-defizienter Tumore infolge infiltrierender Makrophagen, die aufgrund der Freisetzung von HMGB1 (High Mobility Group Protein B1) durch nekrotische Zellen vermehrt rekrutiert werden (Guerriero *et al.*, 2008). In Zusammenhang mit einer verstärkten Rekrutierung von NK-Zellen belegt eine Studie, dass die Expression des Chemokins Chemerin (RARRES2) die Infiltration Natürlicher Killerzellen in Melanome induzieren kann (Pachynski *et al.*, 2012). Eine erhöhte, jedoch nicht signifikante Expression von Chemerin konnte auch in der vorliegenden Arbeit in behandelten KO-Tumoren nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung könnte somit neben der indirekten Rekrutierung von NK-Zellen über die chemotherapeutische Induktion des SASP eine alternative Erklärung für die verstärkte Infiltration von KO-Tumoren durch NK-Zellen sein. Die Depletion von Makrophagen bzw. dendritischen Zellen während der Behandlung wäre daher für weitere Studien ein denkbarer Ansatz, um eine Interleukin-vermittelte NK-Zell-Aktivierung durch diese Immunzellen zu bestätigen bzw. auszuschließen.

Unabhängig von den möglichen Mechanismen, die zu einer Rekrutierung und Aktivierung Natürlicher Killerzellen führen, spielt die Effizienz eine wichtige Rolle, mit der NK-Zellen Tumorzellen erkennen und eliminieren können. NK-Zellen interagieren über aktivierende und inhibitorische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche mit den NK-Zell-Liganden der Zielzelle. Die verstärkte Repräsentation (*induced-self recognition*) bzw. die Herunterregulierung (*missing-self recognition*) dieser Liganden auf der Tumorzelle induziert dabei die NK-Zell-vermittelte Lyse. Verschiedene Studien zeigen, dass sich infolge einer DNA-Stressantwort die Expression der NK-Zell-Liganden auf Tumorzellen verändern kann. So bewirkt die chemotherapeutische Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika die verminderte Expression des inhibitorischen Liganden CLRB auf Lymphom (C1498)- sowie Fibroblasten (NIH3T3)-Zelllinien (Fine *et al.*, 2010). Hingegen steigert die Behandlung mit Cisplatin die Expression der aktivierenden NKG2D-Liganden RAET1 und MULT1 in Ovar-Epithelzellen (Gasser *et al.*, 2005). Seneszente Lebersternzellen weisen als DNA-Stressantwort im Rahmen einer Leberfibrose eine Hochregulierung des NKG2D-Liganden MICA auf (Krizhanovsky *et al.*, 2008). Die erhöhte Anzahl seneszenten Zellen könnte infolge einer verstärkten DNA-Stressantwort nach Chemotherapie auch die Expression von NK-Zell-Liganden auf Tumorzellen aus Mäusen mit einer Deletion von myeloid Zell-spezifischem VEGF steigern. In der vorliegenden Studie wurden deshalb zwei NK-Zell-Liganden auf Genexpressionsebene näher untersucht. Die Ergebnisse zeigen für die NKG2D-Liganden RAET1 (für aktivierende Rezeptoren) und CLRB (für inhibierende Rezeptoren) keinerlei signifikante Expressionsunterschiede in behandelten WT und KO-Tumoren (Daten nicht gezeigt), allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass NK-



Zell-Liganden trotzdem unterschiedlich stark auf der Tumorzelle repräsentiert sind. Um dies zu überprüfen, wäre eine durchflusszytomterische Analyse der Tumore für RAET1, CLRB oder auch weitere NK-Zell-Liganden eine geeignete Methode.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass Immunzellen eine wichtige Funktion im Rahmen der Elimination seneszenten Zellen übernehmen. Andererseits konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem selbst an der Seneszenzinduktion in Tumoren beteiligt ist. So zeigen Rakhra *et al.* (2010), dass die Doxycyclin-induzierbare Inaktivierung des Onkogens *Myc* in einem T-ALL (T-cell acute lymphoblastic leukaemia)-Mausmodell in einer Tumoregression resultiert. Die Tumore zeigen dabei u.a. vermehrte SA- $\beta$ -gal-Aktivität in Verbindung mit einer gesteigerten p21-Expression sowie eine Inhibierung der Angiogenese. Die Inaktivierung von *Myc* in CD4-T-Zell-defizienten sowie Rag2-defizienten Mäusen führt zu einer schnellen Tumorprogression, einhergehend mit dem Verlust der Seneszenzinduktion und einer verstärkten Angiogenese in den Tumoren. Grund hierfür ist die Abwesenheit eines intakten Immunsystems, das insbesondere durch eine CD4-T-Zell-vermittelte Expression von Thrombospondin-1 (TSP-1) die Seneszenz in Tumoren induziert und zu einer Regression tumoraler Blutgefäße führt. Die Induktion der Seneszenz kann somit also auch durch die Freisetzung verschiedener Zytokine der Immunzellen erfolgen. Sowohl die Immunüberwachung seneszenten Zellen als auch die Immunzell-abhängige Induktion seneszenten Zellen unterstreichen weiter, dass die vielfältigen Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem im Rahmen der Tumorprogression eine wichtige Rolle spielen. Insbesondere Studien für verschiedene humane Tumore werden jedoch in immundefizienten Mäusen durchgeführt, so dass der mögliche Einfluss des Immunsystems auf die Tumorentwicklung nicht erfasst werden kann.

Myeloische Zellen zeigen unter hypoxischen Bedingungen eine pro-inflammatorische Immunantwort. HIF-1 $\alpha$  reguliert dabei verschiedenen Funktionen in diesen Zellen, wie z.B. die ATP-Produktion in hypoxischen entzündeten Geweben, wodurch u.a. die Motilität sowie bakterizide Wirkung myeloischer Zellen stimuliert wird (Cramer *et al.*, 2003; Peyssonnaud *et al.*, 2005). Zudem verlängert HIF-1 $\alpha$  durch die Inhibierung von Apoptose die Überlebensfähigkeit neutrophiler Zellen (Walmsley *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu übt Hypoxie durch Apoptose-Induktion in T-Zellen in vielen Fällen einen inhibitorischen Effekt aus. (Sun *et al.*, 2010). Bisher sind noch keine Studien bekannt, die den Zusammenhang zwischen Hypoxie und NK-Zell-Funktionen näher beschreiben. Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass die Aktivität von NK-Zellen unter hypoxischen Bedingungen eingeschränkt ist und in KO-Tumoren, die eine verbesserte Sauerstoffversorgung aufweisen, eine höhere Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen vermitteln. Zudem ist bekannt, dass Hypoxie *in vitro* ein sogenanntes „shedding“ des NKG2D Liganden MICA auf Tumorzellen bewirken kann, welche in Folge nicht von NK-Zellen erkannt werden können (Siemens *et al.*, 2008). Dieser sogenannte Escape-Mechanismus der Tumorzelle ermöglicht der Tumorzelle also der NK-Zell-basierten Immunantwort zu entgehen.

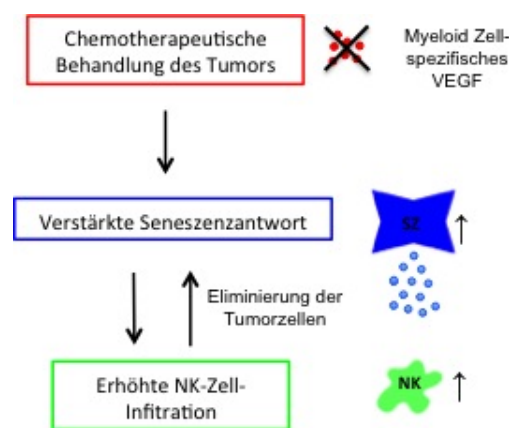
## 5.4 Die Bedeutung Tumorzell-intrinsischer Seneszenz für die Tumorprogression und Rezidivbildung

Chemotherapeutisch behandelte WT- und KO-Tumore sind der in der Lage, nach Entnahme ihre charakteristischen Merkmale der Seneszenz unter *ex vivo* Konditionen weitestgehend beizubehalten und nach Transplantation in einen naïven Host die im Ursprungshost beschriebenen Effekte zu reproduzieren. Die Tumorzellen zeigen eine Art „Memory-Effekt“, mithilfe dessen die Zellen die Fähigkeit besitzen, durch die Rekrutierung von Makrophagen, dendritischen Zellen sowie NK-Zellen erneut eine verstärkte Immunantwort im Verlauf der Tumorentwicklung auszulösen, einhergehend mit einer erhöhten Zytokin- und Interferon-Expression (Abb. 4.24, 4.26). Transplantierte KO-Tumore zeigen dabei erneut, bedingt durch eine gesteigerte NK-Zell-Infiltration und nachfolgende Eliminierung seneszenten Zellen, eine langsamere Wachstumskinetik im Vergleich zu WT-transplantierten Tumoren (Abb. 4.27, 4.28). Um in diesem Zusammenhang einen weiteren Nachweis für eine NK-Zell-abhängige Immunüberwachung der seneszenten Zellen zu erhalten, wäre es denkbar, die NK-Zellen nach Transplantation der WT- und KO-Tumore im neuen Host zu depletieren und die Anzahl seneszenten Zellen nach der Tumorentwicklung zu bestimmen. Wichtig ist festzuhalten, dass im Vergleich zum Ursprungshost intratumorale VEGF-Konzentrationen, der Blutgefäß-Phänotyp sowie der Anteil hypoxischer Bereiche in den Tumoren keine Unterschiede mehr aufweisen. Die Ursachen für das verzögerte Rezidiv sind somit in erster Linie mit Tumorzell-intrinsischen Eigenschaften zu begründen und nicht mit Genotyp-spezifischen Unterschieden des Tumormikromilieus. Die Deletion von VEGF in myeloischen Zellen ermöglicht jedoch als Gefäß-modulierender Faktor eine verbesserte chemotherapeutische Wirkung im Tumor, durch die die Tumorzellen ihre intrinsischen Eigenschaften entwickeln.

Die Eliminierung seneszenten Zellen stellt einen wichtigen Mechanismus in Bezug auf die Rezidivbildung eines Tumors dar. Obwohl Seneszenz generell als irreversibler Zellzyklus-Arrest definiert wird, bei der die Zelle metabolisch zwar weiterhin aktiv bleibt, aber nicht in der Lage ist weiter zu proliferieren, zeigen verschiedene Studien, dass durch eine extrinsische Veränderung wichtiger Mediatoren des G1-Zellzyklus-Arrests der Phänotyp seneszenten Zellen aufgehoben werden kann. Die Inaktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p16 und p21 bzw. die Neutralisierung von p53 in seneszenten Fibroblasten sowie die Mutation des Retinoblastoma-Proteins (pRb) in embryonalen Keimzellen sind beschriebene Möglichkeiten für den Wiedereintritt seneszenten Zellen in den Zellzyklus (Gire & Wynford-Thomas, 1998; Pajalunga *et al.*, 2007; Sage *et al.*, 2003). Diese Erkenntnisse sind hinsichtlich einer Tumorbehandlung von großer Bedeutung, da eine chemotherapeutische Behandlung zum Großteil nur auf proliferierende Zellen wirkt und somit seneszente Zellen weniger empfänglich für eine zytotoxische Therapie sind. Der

mögliche Eintritt in den Zellzyklus nach erfolgter Chemotherapie fördert somit das Risiko des Tumorrezidivs. Eine Akkumulation seneszenten Zellen, wie sie nach Behandlung in WT-Tumoren zu beobachten ist, erhöht dabei die Gefahr der Tumorrückbildung. Ein Grund hierfür ist zum einen die größere Wahrscheinlichkeit, mit der die seneszenten Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten können, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass seneszente Zellen durch die Änderung ihres SASP tumorfördernde Faktoren sezernieren und somit die Tumorprogression beschleunigen (Rodier & Campisi, 2011).

Anhand der beschriebenen Ergebnisse lässt sich abschließend ein hypothetischer Mechanismus ableiten, mit dem das verzögerte Tumorrezidiv chemotherapeutisch behandelter Tumore in Mäusen mit einer genetischen Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen erklärt werden kann (Abb. 5.1). Der Verlust von myeloid Zell-spezifischem VEGF führt im Tumor zu einer Normalisierung der Blutgefäße, durch die infolge einer verbesserten Oxygenierung des Tumors die chemotherapeutische Behandlung eine verstärkte Seneszenz der Tumorzellen induzieren kann. Bedingt durch einen ausgeprägteren Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) sezernieren seneszente Zellen verstärkt immunregulatorische und inflammatorische Faktoren, die letzten Endes zu einer erhöhten Anzahl infiltrierender NK-Zellen führen, welche im Gegenzug seneszente Tumorzellen erkennen und eliminieren. Aus der geringeren Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors durch die Reduzierung proliferierender Zellen und der vermehrten Eliminierung von Tumorzellen resultiert somit eine verzögerte Rezidivbildung nach Chemotherapie mit signifikant geringerem Tumolvolumen im Vergleich zu behandelten WT-Tumoren.



**Abb. 5.1:** Hypothetischer Mechanismus für eine verzögerte Tumorrückbildung chemotherapeutischer behandelter Tumore in Mäusen mit einer genetischen Inaktivierung für VEGF in myeloischen Zellen. SZ: Seneszente Zelle; NK: NK-Zelle.

## 6 Zusammenfassung

Der Prozess der Angiogenese ist entscheidend für das Wachstum und die spätere Metastasierung maligner Tumore. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ist dabei für die Rekrutierung und Proliferation von Endothelzellen sowie die Bildung neuer Blutgefäße von zentraler Bedeutung und gilt als Hauptmediator der Tumorangiogenese. Trotz vielversprechender Ergebnisse antiangiogener Therapieansätze, die auf eine Gefäßnormalisierung im Tumor abzielen und dadurch initial die Effizienz einer chemotherapeutischen Behandlung steigern, herrscht in vielen Fällen unzureichende Kenntnis über langfristige Effekte und mögliche Auswirkungen auf die Rezidivbildung des Tumors.

Myeloische Zellen, darunter tumorassoziierte Makrophagen, sind in der Lage, den Tumor zu infiltrieren und tragen durch die Sezernierung von VEGF entscheidend zur Bildung neuer Blutgefäße bei. Die genetische Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen führt dabei in einem murinen Modell für subkutane Lewis Lung Carcinoma- und B16F10-Tumore nach Chemotherapie zu einem verzögerten Tumorrezidiv mit signifikant kleinerem Tumorumfang im Vergleich zu behandelten Wildtyp-Tumoren. Durch eine Normalisierung tumoraler Gefäße und dadurch verbesserte Sauerstoffversorgung des Tumors in Abwesenheit von myeloid Zell-spezifischem VEGF bewirkt die chemotherapeutische Behandlung mit Cisplatin eine verstärkte Seneszenzinduktion in Tumorzellen, die infolge einer vermehrten Sezernierung immunmodulierender Faktoren insbesondere die Rekrutierung Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) in den Tumor fördern, welche im Gegenzug seneszente Zellen erkennen und eliminieren. Die Depletion intratumoraler NK-Zellen nach chemotherapeutischer Behandlung resultiert in der Akkumulation seneszenten Zellen und Zunahme des Tumorumfangs nach Tumorrezidiv in Mäusen mit einer spezifischen VEGF-Inaktivierung in myeloischen Zellen und unterstützt somit die Theorie einer NK-Zell-abhängigen Immunüberwachung seneszenten Zellen.

Die Transplantation chemotherapeutisch behandelter WT- und KO-Tumore in naive C57-Bl6/J-Mäuse induziert unabhängig vom Gefäßphänotyp und der Oxygenierung des Tumors erneut eine stärkere Infiltration von KO > C57Bl6/J-Tumoren durch Immunzellen, einhergehend mit einem verlangsamten Tumorstadium und vermehrter Eliminierung seneszenten Zellen im Vergleich zu WT > C57Bl6/J-Tumoren. Ein verzögertes Tumorrezidiv nach Chemotherapie durch die Deletion von VEGF in myeloischen Zellen ist demnach von einer Tumorzell-intrinsischen Seneszenzantwort abhängig. Die Möglichkeit einer verbesserten Seneszenz-induzierten Immunüberwachung infolge einer Normalisierung tumoraler Blutgefäße bietet somit eine neue Grundlage für antiangiogene Behandlungsstrategien.

## 7 Literaturverzeichnis

- ACOSTA, J.C. & GIL, J. (2009). A role for CXCR2 in senescence, but what about in cancer? *Cancer Res*, **69**, 2167–70.
- ACOSTA, J.C., O'LOGHLEN, A., BANITO, A., GUIJARRO, M.V., AUGERT, A., RAGUZ, S., FUMAGALLI, M., COSTA, M.D., BROWN, C., POPOV, N., TAKATSU, Y., MELAMED, J., D'ADDA DI FAGAGNA, F., BERNARD, D., HERNANDO, E. & GIL, J. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, **133**, 1006–18.
- AGARWAL, M.L., AGARWAL, A., TAYLOR, W.R. & STARK, G.R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 8493–7.
- AHN, G.O., TSENG, D., LIAO, C.H., DORIE, M.J., CZECHOWICZ, A. & BROWN, J.M. (2010). Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 8363–8.
- AHNEN, D.J., FEIGL, P., QUAN, G., FENOGLIO-PREISER, C., LOVATO, L.C., BUNN, P.A., STEMMERMAN, G., WELLS, J.D., MACDONALD, J.S. & MEYSKENS, F.L. (1998). Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res*, **58**, 1149–58.
- AKAGI, M., KAWAGUCHI, M., LIU, W., MCCARTY, M.F., TAKEDA, A., FAN, F., STOELTZING, O., PARIKH, A.A., JUNG, Y.D., BUCANA, C.D., MANSFIELD, P.F., HICKLIN, D.J. & ELLIS, L.M. (2003). Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *Br J Cancer*, **88**, 796–802.
- ALCORTA, D.A., XIONG, Y., PHELPS, D., HANNON, G., BEACH, D. & BARRETT, J.C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 13742–7.
- ALIOUAT-DENIS, C.M., DENDOUGA, N., DEN WYNGAERT, I.V., GOEHLMANN, H., STELLER, U., VAN DE WEYER, I., SLYCKEN, N.V., ANDRIES, L., KASS, S., LUYTEN, W., JANICOT, M. & VIALARD, J.E. (2005). p53-independent regulation of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> expression and senescence by Chk2. *Mol Cancer Res*, **3**, 627–34.
- ANCRILE, B., LIM, K.H. & COUNTER, C.M. (2007). Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev*, **21**, 1714–9.
- ANGELOV, L., SALHIA, B., RONCARI, L., MCMAHON, G. & GUHA, A. (1999). Inhibition of angiogenesis by blocking activation of the vascular endothelial growth factor receptor 2 leads to decreased growth of neurogenic sarcomas. *Cancer Res*, **59**, 5536–41.
- ANKOMA-SEY, V., WANG, Y. & DAI, Z. (2000). Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, **31**, 141–8.

- ASAHARA, T., MUROHARA, T., SULLIVAN, A., SILVER, M., VAN DER ZEE, R., LI, T., WITZENBICHLER, B., SCHATTEMAN, G. & ISNER, J.M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, **275**, 964–7.
- ASAHARA, T., MASUDA, H., TAKAHASHI, T., KALKA, C., PASTORE, C., SILVER, M., KEARNE, M., MAGNER, M. & ISNER, J.M. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, **85**, 221–8.
- BALUK, P., MORIKAWA, S., HASKELL, A., MANCUSO, M. & McDONALD, D.M. (2003). Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol*, **163**, 1801–15.
- BARRY, M.A., BEHNKE, C.A. & EASTMAN, A. (1990). Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol*, **40**, 2353–62.
- BARTEL, H. & LAMETSCHWANDTNER, A. (2000). Intussusceptive microvascular growth in the lung of larval *Xenopus laevis* Daudin: a light microscope, transmission electron microscope and SEM study of microvascular corrosion casts. *Anat Embryol*, **202**, 55–65.
- BARTKOVA, J., HOREJSÍ, Z., KOED, K., KRÄMER, A., TORT, F., ZIEGER, K., GULDBERG, P., SEHESTED, M., NESLAND, J.M., LUKAS, C., ØRNTOT, T., LUKAS, J. & BARTEK, J. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, **434**, 864–70.
- BARTKOVA, J., REZAEI, N., LIONTOS, M., KARAKAIDOS, P., KLETSAS, D., ISSAEVA, N., VASSILIOU, L.V.F., KOLETTAS, E., NIFOROU, K., ZOUMPOURLIS, V.C., TAKAOKA, M., NAKAGAWA, H., TORT, F., FUGGER, K., JOHANSSON, F., SEHESTED, M., ANDERSEN, C.L., DYRSKJOT, L., ØRNTOT, T., LUKAS, J., KITTAS, C., HELLEDAY, T., HALAZONETIS, T.D., BARTEK, J. & GORGOULIS, V.G. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, **444**, 633–7.
- BECKER, B.F., HEINDL, B., KUPATT, C. & ZAHLER, S. (2000). Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol*, **89**, 160–7.
- BERGERS, G. & BENJAMIN, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, **3**, 401–10.
- BERGERS, G. & HANAHAN, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*, **8**, 592–603.
- BHATIA, B., MULTANI, A.S., PATRAWALA, L., CHEN, X., CALHOUN-DAVIS, T., ZHOU, J., SCHROEDER, L., SCHNEIDER-BROUSSARD, R., SHEN, J., PATHAK, S., CHANG, S. & TANG, D.G. (2008). Evidence that senescent human prostate epithelial cells enhance tumorigenicity:

- cell fusion as a potential mechanism and inhibition by p16INK4a and hTERT. *Int J Cancer*, **122**, 1483–95.
- BIGLER, S.A., DEERING, R.E. & BRAWER, M.K. (1993). Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum Pathol*, **24**, 220–6.
- BIRK, D.M., BARBATO, J., MUREEBE, L. & CHAER, R.A. (2008). Current insights on the biology and clinical aspects of VEGF regulation. *Vasc Endovascular Surg*, **42**, 517–30.
- BOCK, K.D., MAZZONE, M. & CARMELIET, P. (2011). Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not? *Nat Rev Clin Oncol*, **8**, 393–404.
- BODE, A.M. & DONG, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, **4**, 793–805.
- BRADLEY, M., ZEYTUN, A., RAFI-JANAJREH, A., NAGARKATTI, P.S. & NAGARKATTI, M. (1998). Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas+ and Fas- tumor cells. *Blood*, **92**, 4248–55.
- BRADY, J., CAROTTA, S., THONG, R.P.L., CHAN, C.J., HAYAKAWA, Y., SMYTH, M.J. & NUTT, S.L. (2010). The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation. *J Immunol*, **185**, 6679–88.
- BRAIG, M., LEE, S., LODDENKEMPER, C., RUDOLPH, C., PETERS, A.H.F.M., SCHLEGELBERGER, B., STEIN, H., DÖRKEN, B., JENUWEIN, T. & SCHMITT, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, **436**, 660–5.
- BRINGOLD, F. & SERRANO, M. (2000). Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol*, **35**, 317–29.
- BROWDER, T., BUTTERFIELD, C.E., KRÄLING, B.M., SHI, B., MARSHALL, B., O'REILLY, M.S. & FOLKMAN, J. (2000). Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res*, **60**, 1878–86.
- BROXTERMAN, H.J., LANKELMA, J. & HOEKMAN, K. (2003). Resistance to cytotoxic and anti-angiogenic anticancer agents: similarities and differences. *Drug Resist Updat*, **6**, 111–27.
- BURRI, P.H. (1992). Intussusceptive microvascular growth, a new mechanism of capillary network formation. *EXS*, **61**, 32–9.
- CARLYLE, J.R., JAMIESON, A.M., GASSER, S., CLINGAN, C.S., ARASE, H. & RAULET, D.H. (2004). Missing self-recognition of Ocl/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 3527–32.
- CARMELIET, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, **6**, 389–95.
- CARMELIET, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, **9**, 653–60.

- CARMELIET, P., FERREIRA, V., BREIER, G., POLLEFEYT, S., KIECKENS, L., GERTSENSTEIN, M., FAHRIG, M., VANDENHOECK, A., HARPAL, K., EBERHARDT, C., DECLERCQ, C., PAWLING, J., MOONS, L., COLLEN, D., RISAU, W. & NAGY, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, **380**, 435–9.
- CARMELIET, P., MOONS, L., LUTTUN, A., VINCENTI, V., COMPERNOLLE, V., MOL, M.D., WU, Y., BONO, F., DEVY, L., BECK, H., SCHOLZ, D., ACKER, T., DiPALMA, T., DEWERCHIN, M., NOEL, A., STALMANS, I., BARRA, A., BLACHER, S., VANDENDRIESSCHE, T., PONTEN, A., ERIKSSON, U., PLATE, K.H., FOIDART, J.M., SCHAPER, W., CHARNOCK-JONES, D.S., HICKLIN, D.J., HERBERT, J.M., COLLEN, D. & PERSICO, M.G. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*, **7**, 575–83.
- CHANG, B.D., BROUDE, E.V., DOKMANOVIC, M., ZHU, H., RUTH, A., XUAN, Y., KANDEL, E.S., LAUSCH, E., CHRISTOV, K. & RONINSON, I.B. (1999a). A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res*, **59**, 3761–7.
- CHANG, B.D., XUAN, Y., BROUDE, E.V., ZHU, H., SCHOTT, B., FANG, J. & RONINSON, I.B. (1999b). Role of p53 and p21<sup>waf1/cip1</sup> in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*, **18**, 4808–18.
- CHANG, B.D., SWIFT, M.E., SHEN, M., FANG, J., BROUDE, E.V. & RONINSON, I.B. (2002). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 389–94.
- CHEN, J.H., STOEBER, K., KINGSBURY, S., OZANNE, S.E., WILLIAMS, G.H. & HALES, C.N. (2004). Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *J Biol Chem*, **279**, 49439–46.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156–9.
- CHU, G. (1994). Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem*, **269**, 787–90.
- CICCIA, A. & ELLEDGE, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, **40**, 179–204.
- CINES, D.B., POLLAK, E.S., BUCK, C.A., LOSCALZO, J., ZIMMERMAN, G.A., MCEVER, R.P., POBER, J.S., WICK, T.M., KONKLE, B.A., SCHWARTZ, B.S., BARNATHAN, E.S., MCCRAE, K.R., HUG, B.A., SCHMIDT, A.M. & STERN, D.M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, **91**, 3527–61.



- CLUBBS, E.A. & BOMSER, J.A. (2007). Glycitein activates extracellular signal-regulated kinase via vascular endothelial growth factor receptor signaling in nontumorigenic (RWPE-1) prostate epithelial cells. *J Nutr Biochem*, **18**, 525–32.
- COHEN, T., NAHARI, D., CEREM, L.W., NEUFELD, G. & LEVI, B.Z. (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, **271**, 736–41.
- COLLADO, M., GIL, J., EFEYAN, A., GUERRA, C., SCHUHMACHER, A.J., BARRADAS, M., BENGURÍA, A., ZABALLOS, A., FLORES, J.M., BARBACID, M., BEACH, D. & SERRANO, M. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, **436**, 642.
- COLOTTA, F., ALLAVENA, P., SICA, A., GARLANDA, C. & MANTOVANI, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, **30**, 1073–81.
- COPPÉ, J.P., PATIL, C.K., RODIER, F., SUN, Y., MUÑOZ, D.P., GOLDSTEIN, J., NELSON, P.S., DESPREZ, P.Y. & CAMPISI, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, **6**, 2853–68.
- COPPÉ, J.P., DESPREZ, P.Y., KRTOLICA, A. & CAMPISI, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, **5**, 99–118.
- CRAMER, T., YAMANISHI, Y., CLAUSEN, B.E., FÖRSTER, I., PAWLINSKI, R., MACKMAN, N., HAASE, V.H., JAENISCH, R., CORR, M., NIZET, V., FIRESTEIN, G.S., GERBER, H.P., FERRARA, N. & JOHNSON, R.S. (2003). HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*, **112**, 645–57.
- DAMERT, A., MIQUEROL, L., GERTSENSTEIN, M., RISAU, W. & NAGY, A. (2002). Insufficient VEGFA activity in yolk sac endoderm compromises haematopoietic and endothelial differentiation. *Development*, **129**, 1881–92.
- DAVALOS, A.R., COPPE, J.P., CAMPISI, J. & DESPREZ, P.Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*, **29**, 273–83.
- DEJANA, E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 261–70.
- DESHMANE, S.L., KREMLEV, S., AMINI, S. & SAWAYA, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, **29**, 313–26.
- DETMAR, M., YEO, K.T., NAGY, J.A., DE WATER, L.V., BROWN, L.F., BERSE, B., ELICKER, B.M., LEDBETTER, S. & DVORAK, H.F. (1995). Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*, **105**, 44–50.

- DIMRI, G.P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E.E., LINSKENS, M., RUBELJ, I. & PEREIRA-SMITH, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 9363–7.
- DISTLER, J.H.W., HIRTH, A., KUROWSKA-STOLARSKA, M., GAY, R.E., GAY, S. & DISTLER, O. (2003). Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med*, **47**, 149–61.
- DJONOV, V., SCHMID, M., TSCHANZ, S.A. & BURRI, P.H. (2000). Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res*, **86**, 286–92.
- DONG, J., GRUNSTEIN, J., TEJADA, M., PEALE, F., FRANTZ, G., LIANG, W.C., BAI, W., YU, L., KOWALSKI, J., LIANG, X., FUH, G., GERBER, H.P. & FERRARA, N. (2004). VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *EMBO J*, **23**, 2800–10.
- DOUGAN, M. & DRANOFF, G. (2009). The immune response to tumors. *Curr Protoc Immunol*, **Chapter 20**, Unit 20.11.
- DUMAY, A., FEUGEAS, J.P., WITTMER, E., LEHMANN-CHE, J., BERTHEAU, P., ESPIÉ, M., PLASSA, L.F., COTTU, P., MARTY, M., ANDRÉ, F., SOTIRIOU, C., PUSZTAI, L. & DE THÉ, H. (2013). Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. *Int J Cancer*, **132**, 1227–31.
- DUNN, G.P., OLD, L.J. & SCHREIBER, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.*, **22**, 329–60.
- DVORAK, H.F., ORENSTEIN, N.S., CARVALHO, A.C., CHURCHILL, W.H., DVORAK, A.M., GALLI, S.J., FEDER, J., BITZER, A.M., RYPYSC, J. & GIOVINCO, P. (1979). Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. *J Immunol*, **122**, 166–74.
- EBOS, J.M.L. & KERBEL, R.S. (2011). Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol*, **8**, 210–21.
- EBOS, J.M.L., LEE, C.R., CRUZ-MUNOZ, W., BJARNASON, G.A., CHRISTENSEN, J.G. & KERBEL, R.S. (2009a). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, **15**, 232–9.
- EBOS, J.M.L., LEE, C.R. & KERBEL, R.S. (2009b). Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res*, **15**, 5020–5.
- EGEBLAD, M., NAKASONE, E.S. & WERB, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*, **18**, 884–901.

- ELLIS, L.M. & HICKLIN, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*, **8**, 579–91.
- EWALD, J.A., DESOTELLE, J.A., WILDING, G. & JARRARD, D.F. (2010). Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst*, **102**, 1536–46.
- FAN, F., WEY, J.S., MCCARTY, M.F., BELCHEVA, A., LIU, W., BAUER, T.W., SOMCIO, R.J., WU, Y., HOOPER, A., HICKLIN, D.J. & ELLIS, L.M. (2005). Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene*, **24**, 2647–53.
- FAN, S., EL DEIRY, W.S., BAE, I., FREEMAN, J., JONDLE, D., BHATIA, K., FORNACE, A.J., MAGRATH, I., KOHN, K.W. & O’CONNOR, P.M. (1994). p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res*, **54**, 5824–30.
- FANG, K., CHIU, C.C., LI, C.H., TA CHANG, Y. & TEIN HWANG, H. (2007). Cisplatin-induced senescence and growth inhibition in human non-small cell lung cancer cells with ectopic transfer of p16<sup>INK4a</sup>. *Oncol Res*, **16**, 479–88.
- FARAG, S.S., FEHNIGER, T.A., RUGGERI, L., VELARDI, A. & CALIGIURI, M.A. (2002). Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*, **100**, 1935–47.
- FAURIAT, C., LONG, E.O., LJUNGGREN, H.G. & BRYCESON, Y.T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*, **115**, 2167–76.
- FENTON, B.M., PAONI, S.F. & DING, I. (2004). Pathophysiological effects of vascular endothelial growth factor receptor-2-blocking antibody plus fractionated radiotherapy on murine mammary tumors. *Cancer Res*, **64**, 5712–9.
- FERNANDEZ, N.C., LOZIER, A., FLAMENT, C., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., BELLET, D., SUTER, M., PERRICAUDET, M., TURSZ, T., MARASKOVSKY, E. & ZITVOGEL, L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med*, **5**, 405–11.
- FERRARA, N. (2000). Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res*, **55**, 15–35; discussion 35–6.
- FERRARA, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, **25**, 581–611.
- FERRARA, N. & DAVIS-SMYTH, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, **18**, 4–25.

- FERRARA, N. & KERBEL, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, **438**, 967–974.
- FERRARA, N. & KEYT, B. (1997). Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *EXS*, **79**, 209–32.
- FERRARA, N., HOUCK, K.A., JAKEMAN, L.B., WINER, J. & LEUNG, D.W. (1991). The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem*, **47**, 211–8.
- FERRARA, N., CARVER-MOORE, K., CHEN, H., DOWD, M., LU, L., O'SHEA, K.S., POWELL-BRAXTON, L., HILLAN, K.J. & MOORE, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, **380**, 439–42.
- FINDLAY, J.K. (1986). Angiogenesis in reproductive tissues. *J Endocrinol*, **111**, 357–66.
- FINE, J.H., CHEN, P., MESCI, A., ALLAN, D.S.J., GASSER, S., RAULET, D.H. & CARLYLE, J.R. (2010). Chemotherapy-induced genotoxic stress promotes sensitivity to natural killer cell cytotoxicity by enabling missing-self recognition. *Cancer Res*, **70**, 7102–13.
- FISHER, D.E. (1994). Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*, **78**, 539–42.
- FOGLER, W.E., VOLKER, K., WATANABE, M., WIGGINTON, J.M., ROESSLER, P., BRUNDA, M.J., ORTALDO, J.R. & WILTROUT, R.H. (1998). Recruitment of hepatic NK cells by IL-12 is dependent on IFN-gamma and VCAM-1 and is rapidly down-regulated by a mechanism involving T cells and expression of Fas. *J Immunol*, **161**, 6014–21.
- FOLKMAN, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, **285**, 1182–6.
- FOLKMAN, J. (1975). Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann Intern Med*, **82**, 96–100.
- FOLKMAN, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*, **29**, 15–8.
- FOLKMAN, J. (2003). Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*, **3**, 643–51.
- FRANK, S., HÜBNER, G., BREIER, G., LONGAKER, M.T., GREENHALGH, D.G. & WERNER, S. (1995). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, **270**, 12607–13.
- FRIDMAN, W.H., GALON, J., PAGÈS, F., TARTOUR, E., SAUTÈS-FRIDMAN, C. & KROEMER, G. (2011). Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res*, **71**, 5601–5.
- FYLES, A.W., MILOSEVIC, M., WONG, R., KAVANAGH, M.C., PINTILIE, M., SUN, A., CHAPMAN, W., LEVIN, W., MANCHUL, L., KEANE, T.J. & HILL, R.P. (1998). Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radiother Oncol*, **48**, 149–56.

- GABRILOVICH, D., ISHIDA, T., OYAMA, T., RAN, S., KRAVTSOV, V., NADAF, S. & CARBONE, D.P. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood*, **92**, 4150–66.
- GABRILOVICH, D.I., CHEN, H.L., GIRGIS, K.R., CUNNINGHAM, H.T., MENY, G.M., NADAF, S., KAVANAUGH, D. & CARBONE, D.P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med*, **2**, 1096–103.
- GABRILOVICH, D.I., ISHIDA, T., NADAF, S., OHM, J.E. & CARBONE, D.P. (1999). Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin Cancer Res*, **5**, 2963–70.
- GAILLARD, I., KERAMIDAS, M., LIAKOS, P., VILGRAIN, I., FEIGE, J.J. & VITTET, D. (2000). ACTH-regulated expression of vascular endothelial growth factor in the adult bovine adrenal cortex: a possible role in the maintenance of the microvasculature. *J Cell Physiol*, **185**, 226–34.
- GASPARINI, G. (2000). Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist*, **5 Suppl 1**, 37–44.
- GASSER, S. & RAULET, D.H. (2006). The DNA damage response arouses the immune system. *Cancer Res*, **66**, 3959–62.
- GASSER, S., ORSULIC, S., BROWN, E.J. & RAULET, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*, **436**, 1186–90.
- GIRE, V. & WYNFORD-THOMAS, D. (1998). Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. *Mol Cell Biol*, **18**, 1611–21.
- GLODDEK, J., PAGOTTO, U., PEREDA, M.P., ARZT, E., STALLA, G.K. & RENNER, U. (1999). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids regulate the release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells. *J Endocrinol*, **160**, 483–90.
- GOEL, S., DUDA, D.G., XU, L., MUNN, L.L., BOUCHER, Y., FUKUMURA, D. & JAIN, R.K. (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev*, **91**, 1071–121.
- GOLDMAN, C.K., KIM, J., WONG, W.L., KING, V., BROCK, T. & GILLESPIE, G.Y. (1993). Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell*, **4**, 121–33.

- GORGOLIS, V.G. & HALAZONETIS, T.D. (2010). Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Current Opinion in Cell Biology*, **22**, 816–27.
- GOTTESMAN, M.M., FOJO, T. & BATES, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, **2**, 48–58.
- GRAEBER, T.G., OSMANIAN, C., JACKS, T., HOUSMAN, D.E., KOCH, C.J., LOWE, S.W. & GIACCIA, A.J. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, **379**, 88–91.
- GUERRIERO, J.L., DITSWORTH, D., FAN, Y., ZHAO, F., CRAWFORD, H.C. & ZONG, W.X. (2008). Chemotherapy induces tumor clearance independent of apoptosis. *Cancer Res*, **68**, 9595–600.
- GULENG, B., TATEISHI, K., KANAI, F., JAZAG, A., OHTA, M., ASAOKA, Y., IJICHI, H., TANAKA, Y., IMAMURA, J., IKENOUE, T., FUKUSHIMA, Y., MORIKANE, K., MIYAGISHI, M., TAIRA, K., KAWABE, T. & OMATA, M. (2005). Cancer-derived VEGF plays no role in malignant ascites formation in the mouse. *World J Gastroenterol*, **11**, 5455–9.
- GUZY, R.D., HOYOS, B., ROBIN, E., CHEN, H., LIU, L., MANSFIELD, K.D., SIMON, M.C., HAMMERLING, U. & SCHUMACKER, P.T. (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab*, **1**, 401–8.
- HAIGH, J.J., GERBER, H.P., FERRARA, N. & WAGNER, E.F. (2000). Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Development*, **127**, 1445–53.
- HALFTECK, G.G., ELBOIM, M., GUR, C., ACHDOUT, H., GHADIALY, H. & MANDELBOIM, O. (2009). Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor Nkp46/NCR1. *J Immunol*, **182**, 2221–30.
- HAMANO, Y., SUGIMOTO, H., SOUBASAKOS, M.A., KIERAN, M., OLSEN, B.R., LAWLER, J., SUDHAKAR, A. & KALLURI, R. (2004). Thrombospondin-1 associated with tumor microenvironment contributes to low-dose cyclophosphamide-mediated endothelial cell apoptosis and tumor growth suppression. *Cancer Res*, **64**, 1570–4.
- HANAHAN, D. & FOLKMAN, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**, 353–64.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646–74.
- HANSEN, W., HUTZLER, M., ABEL, S., ALTER, C., STOCKMANN, C., KLOCHE, S., ALBERT, J., SPARWASSER, T., SAKAGUCHI, S., WESTENDORF, A.M., SCHADENDORF, D., BUER, J. & HELFRICH, I. (2012). Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J Exp Med*, **209**, 2001–16.

- HARVEY, R.P. & ROSENTHAL, N. (1999). Heart Development. **342**, 221–252.
- HASHIZUME, H., BALUK, P., MORIKAWA, S., MCLEAN, J.W., THURSTON, G., ROBERGE, S., JAIN, R.K. & McDONALD, D.M. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*, **156**, 1363–80.
- HE, G., SIDDIK, Z.H., HUANG, Z., WANG, R., KOOMEN, J., KOBAYASHI, R., KHOKHAR, A.R. & KUANG, J. (2005). Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene*, **24**, 2929–43.
- HEITS, F., WIEDEMANN, G.J. & JELKMANN, W. (1998). Vascular endothelial growth factor VEGF stimulates angiogenesis in good and bad situations. *Dtsch Med Wochenschr*, **123**, 259–65.
- HERBERMAN, R.B., NUNN, M.E. & LAVRIN, D.H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer*, **16**, 216–29.
- HILMI, C., GUYOT, M. & PAGÈS, G. (2012). VEGF spliced variants: possible role of anti-angiogenesis therapy. *J Nucleic Acids*, **2012**, 162692.
- HIRATSUKA, S., MARU, Y., OKADA, A., SEIKI, M., NODA, T. & SHIBUYA, M. (2001). Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res*, **61**, 1207–13.
- HLATKY, L., HAHNFELDT, P. & FOLKMAN, J. (2002). Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst*, **94**, 883–93.
- HÖCKEL, M. & VAUPEL, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 266–76.
- HÖCKEL, M., SCHLENGER, K., ARAL, B., MITZE, M., SCHAFFER, U. & VAUPEL, P. (1996). Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res*, **56**, 4509–15.
- HOEBEN, A. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Reviews*, **56**, 549–580.
- HOENICKE, L. & ZENDER, L. (2012). Immune surveillance of senescent cells—biological significance in cancer- and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis*, **33**, 1123–6.
- HOFSETH, L.J., HUSSAIN, S.P. & HARRIS, C.C. (2004). p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 177–81.
- HOLASH, J., MAISONPIERRE, P.C., COMPTON, D., BOLAND, P., ALEXANDER, C.R., ZAGZAG, D., YANCOPOULOS, G.D. & WIEGAND, S.J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, **284**, 1994–8.

- HUANG, J., FRISCHER, J.S., SERUR, A., KADENHE, A., YOKOI, A., MCCRUDDEN, K.W., NEW, T., O'TOOLE, K., ZABSKI, S., RUDGE, J.S., HOLASH, J., YANCOPOULOS, G.D., YAMASHIRO, D.J. & KANDEL, J.J. (2003). Regression of established tumors and metastases by potent vascular endothelial growth factor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 7785–90.
- HURAIRAH, H. & FERRO, A. (2004). The role of the endothelium in the control of vascular function. *Int J Clin Pract*, **58**, 173–83.
- HURWITZ, H. (2004). Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, **4 Suppl 2**, S62–8.
- HURWITZ, H.I., HONEYCUTT, W., HALEY, S. & FAVARO, J. (2006). Long-term treatment with bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer: case report. *Clin Colorectal Cancer*, **6**, 66–9.
- INOUE, K., CHIKAZAWA, M., FUKATA, S., YOSHIKAWA, C. & SHUIN, T. (2003). Docetaxel enhances the therapeutic effect of the angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470) in metastatic human transitional cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **9**, 886–99.
- ISHIDA, A., MURRAY, J., SAITO, Y., KANTHOU, C., BENZAKOUR, O., SHIBUYA, M. & WIJELATH, E.S. (2001). Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, **188**, 359–68.
- IVAN, M., KONDO, K., YANG, H., KIM, W., VALIANDO, J., OHH, M., SALIC, A., ASARA, J.M., LANE, W.S. & KAEIN, W.G. (2001). HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*, **292**, 464–8.
- JAANKOLA, P., MOLE, D.R., TIAN, Y.M., WILSON, M.I., GIELBERT, J., GASKELL, S.J., VON KRIEGSHEIM, A., HEBESTREIT, H.F., MUKHERJI, M., SCHOFIELD, C.J., MAXWELL, P.H., PUGH, C.W. & RATCLIFFE, P.J. (2001). Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 468–72.
- JAIN, R.K. (2002). Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol*, **29**, 3–9.
- JAIN, R.K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*, **9**, 685–93.
- JAIN, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, **307**, 58–62.
- JIANG SHAO, L., SHI, H.Y., AYALA, G., ROWLEY, D. & ZHANG, M. (2008). Haploinsufficiency of the maspin tumor suppressor gene leads to hyperplastic lesions in prostate. *Cancer Res*, **68**, 5143–51.



- JINGJING, L., XUE, Y., AGARWAL, N. & ROQUE, R.S. (1999). Human Müller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **40**, 752–9.
- KÄGI, D., LEDERMANN, B., BÜRKI, K., SEILER, P., ODERMATT, B., OLSEN, K.J., PODACK, E.R., ZINKERNAGEL, R.M. & HENGARTNER, H. (1994a). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, **369**, 31–7.
- KÄGI, D., VIGNAUX, F., LEDERMANN, B., BÜRKI, K., DEPRAETERE, V., NAGATA, S., HENGARTNER, H. & GOLSTEIN, P. (1994b). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*, **265**, 528–30.
- KALKA, C., TAKAHASHI, T., MASUDA, H., ASAHARA, T. & ISNER, J.M. (1999). Vascular endothelial factor (VEGF): therapeutic angiogenesis and vasculogenesis in the treatment of cardiovascular disease. *Med Klin (Munich)*, **94**, 193–201.
- KALLURI, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, **3**, 422–33.
- KAMIJO, T., ZINDY, F., ROUSSEL, M.F., QUELLE, D.E., DOWNING, J.R., ASHMUN, R.A., GROSVELD, G. & SHERR, C.J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19<sup>ARF</sup>. *Cell*, **91**, 649–59.
- KANG, T.W., YEVS, T., WOLLER, N., HOENICKE, L., WUESTEFELD, T., DAUCH, D., HOHMEYER, A., GEREKE, M., RUDALSKA, R., POTAPOVA, A., IKEN, M., VUCUR, M., WEISS, S., HEIKENWALDER, M., KHAN, S., GIL, J., BRUDER, D., MANNS, M., SCHIRMACHER, P., TACKE, F., OTT, M., LUEDDE, T., LONGERICH, T., KUBICKA, S. & ZENDER, L. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, **479**, 547–51.
- KASHIMA, K., OHIKE, N., MUKAI, S., SATO, M., TAKAHASHI, M. & MOROHOSHI, T. (2008). Expression of the tumor suppressor gene maspin and its significance in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *HBPD INT*, **7**, 86–90.
- KAUR, H., LI, J.J., BAY, B.H. & YUNG, L.Y.L. (2013). Investigating the antiproliferative activity of high affinity DNA aptamer on cancer cells. *PLoS ONE*, **8**, e50964.
- KAYAGAKI, N., YAMAGUCHI, N., NAKAYAMA, M., TAKEDA, K., AKIBA, H., TSUTSUI, H., OKAMURA, H., NAKANISHI, K., OKUMURA, K. & YAGITA, H. (1999). Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol*, **163**, 1906–13.
- KE, Q. & COSTA, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*, **70**, 1469–80.
- KELLAND, L.R. (1994). The molecular basis of cisplatin sensitivity/resistance. *Eur J Cancer*, **30A**, 725–7.

- KERBEL, R.S., KOBAYASHI, H. & GRAHAM, C.H. (1994). Intrinsic or acquired drug resistance and metastasis: are they linked phenotypes? *J Cell Biochem*, **56**, 37–47.
- KERBEL, R.S., YU, J., TRAN, J., MAN, S., VILORIA-PETIT, A., KLEMENT, G., COOMBER, B.L. & RAK, J. (2001). Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev*, **20**, 79–86.
- KERR, J.F., WINTERFORD, C.M. & HARMON, B.V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, **73**, 2013–26.
- KIESSLING, R., KLEIN, E. & WIGZELL, H. (1975). "Natural"killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, **5**, 112–7.
- KRIZHANOVSKY, V., YON, M., DICKINS, R.A., HEARN, S., SIMON, J., MIETHING, C., YEE, H., ZENDER, L. & LOWE, S.W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, **134**, 657–67.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L. & BRENNER, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, **87**, 99–163.
- KRTOLICA, A. & CAMPISI, J. (2002). Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1401–14.
- KRTOLICA, A., PARRINELLO, S., LOCKETT, S., DESPREZ, P.Y. & CAMPISI, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 12072–7.
- KSIENZYK, A., NEUMANN, B., NANDAKUMAR, R., FINSTERBUSCH, K., GRASHOFF, M., ZAWATZKY, R., BERNHARDT, G., HAUSER, H. & KRÖGER, A. (2011). IRF-1 expression is essential for natural killer cells to suppress metastasis. *Cancer Res*, **71**, 6410–8.
- KUILMAN, T. & PEEPER, D.S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature Reviews Cancer*, **9**, 81–94.
- KUILMAN, T., MICHALOGLOU, C., VREDEVELD, L.C.W., DOUMA, S., VAN DOORN, R., DESMET, C.J., AARDEN, L.A., MOOI, W.J. & PEEPER, D.S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, **133**, 1019–31.
- KUILMAN, T., MICHALOGLOU, C., MOOI, W.J. & PEEPER, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev*, **24**, 2463–2479.
- KURZ, D.J., DECARY, S., HONG, Y. & ERUSALIMSKY, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, **113** ( Pt 20), 3613–22.

- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–5.
- LANIER, L.L. (1998). Activating and inhibitory NK cell receptors. *Adv Exp Med Biol*, **452**, 13–8.
- LAUWERYS, B.R., GAROT, N., RENAULD, J.C. & HOUSSIAU, F.A. (2000). Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. *J Immunol*, **165**, 1847–53.
- LEE, B.Y., HAN, J.A., IM, J.S., MORRONE, A., JOHUNG, K., GOODWIN, E.C., KLEIJER, W.J., DiMAIO, D. & HWANG, E.S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, **5**, 187–95.
- LEONTIEVA, O.V., NATARAJAN, V., DEMIDENKO, Z.N., BURDELYA, L.G., GUDKOV, A.V. & BLAGOSKLONNY, M.V. (2012). Hypoxia suppresses conversion from proliferative arrest to cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**, 13314–8.
- LEUNG, D.W., CACHIANES, G., KUANG, W.J., GOEDDEL, D.V. & FERRARA, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, **246**, 1306–9.
- LEVY, A.P., LEVY, N.S., WEGNER, S. & GOLDBERG, M.A. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem*, **270**, 13333–40.
- LEWIS, J.S., LANDERS, R.J., UNDERWOOD, J.C., HARRIS, A.L. & LEWIS, C.E. (2000). Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol*, **192**, 150–8.
- LI, J., PERRELLA, M.A., TSAI, J.C., YET, S.F., HSIEH, C.M., YOSHIKUMI, M., PATTERSON, C., ENDEGE, W.O., ZHOU, F. & LEE, M.E. (1995). Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **270**, 308–12.
- LI, Q., XU, B., FU, L. & HAO, X.S. (2006). Correlation of four vascular specific growth factors with carcinogenesis and portal vein tumor thrombus formation in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, **25**, 403–9.
- LIANG, J.T., HUANG, K.C., CHENG, Y.M., HSU, H.C., CHENG, A.L., HSU, C.H., YEH, K.H., WANG, S.M. & CHANG, K.J. (2002). P53 overexpression predicts poor chemosensitivity to high-dose 5-fluorouracil plus leucovorin chemotherapy for stage IV colorectal cancers after palliative bowel resection. *Int J Cancer*, **97**, 451–7.
- LIANG, W.C., WU, X., PEALE, F.V., LEE, C.V., MENG, Y.G., GUTIERREZ, J., FU, L., MALIK, A.K., GERBER, H.P., FERRARA, N. & FUH, G. (2006). Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. *J Biol Chem*, **281**, 951–61.

- LIU, D. & HORNSBY, P.J. (2007). Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res*, **67**, 3117–26.
- LLOYD, P.G., PRIOR, B.M., YANG, H.T. & TERJUNG, R.L. (2003). Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **284**, H1668–78.
- LOGES, S., MAZZONE, M., HOHENSINNER, P. & CARMELIET, P. (2009). Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited. *Cancer Cell*, **15**, 167–70.
- LOGES, S., SCHMIDT, T. & CARMELIET, P. (2010). Mechanisms of resistance to anti-angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates. *Genes Cancer*, **1**, 12–25.
- LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A. & RANDALL, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265–75.
- MA, J., PULFER, S., LI, S., CHU, J., REED, K. & GALLO, J.M. (2001). Pharmacodynamic-mediated reduction of temozolomide tumor concentrations by the angiogenesis inhibitor TNP-470. *Cancer Res*, **61**, 5491–8.
- MACCHIARINI, P., FONTANINI, G., HARDIN, M.J., SQUARTINI, F. & ANGELETTI, C.A. (1992). Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet*, **340**, 145–6.
- MACFARLANE, A.W. & CAMPBELL, K.S. (2006). Signal transduction in natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, **298**, 23–57.
- MAISONPIERRE, P.C., SURI, C., JONES, P.F., BARTUNKOVA, S., WIEGAND, S.J., RADZIEJEWSKI, C., COMPTON, D., MCCLAIN, J., ALDRICH, T.H., PAPADOPOULOS, N., DALY, T.J., DAVIS, S., SATO, T.N. & YANCOPOULOS, G.D. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, **277**, 55–60.
- MALLETTE, F.A., GAUMONT-LECLERC, M.F. & FERBEYRE, G. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev*, **21**, 43–8.
- MANCUSO, M.R., DAVIS, R., NORBERG, S.M., O'BRIEN, S., SENNINO, B., NAKAHARA, T., YAO, V.J., INAI, T., BROOKS, P., FREIMARK, B., SHALINSKY, D.R., HU-LOWE, D.D. & McDONALD, D.M. (2006). Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest*, **116**, 2610–21.
- MARTENS, U.M., CHAVEZ, E.A., POON, S.S., SCHMOOR, C. & LANSDORP, P.M. (2000). Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp Cell Res*, **256**, 291–9.
- MARTTILA-ICHIHARA, F., AUVINEN, K., ELIMA, K., JALKANEN, S. & SALMI, M. (2009). Vascular adhesion protein-1 enhances tumor growth by supporting recruitment of Gr-1+CD11b+ myeloid cells into tumors. *Cancer Res*, **69**, 7875–83.

- MATSUMOTO, T. & CLAESSEON-WELSH, L. (2001). VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*, **2001**, re21.
- MATTOT, V., MOONS, L., LUPU, F., CHERNAVSKY, D., GÓMEZ, R.A., COLLEN, D. & CARMELIET, P. (2002). Loss of the VEGF(164) and VEGF(188) isoforms impairs postnatal glomerular angiogenesis and renal arteriogenesis in mice. *J Am Soc Nephrol*, **13**, 1548–60.
- MAYER, E.L., LIN, N.U. & BURSTEIN, H.J. (2007). Novel approaches to advanced breast cancer: bevacizumab and lapatinib. *J Natl Compr Canc Netw*, **5**, 314–23.
- MCDONALD, D.M. & BALUK, P. (2002). Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res*, **62**, 5381–5.
- MCDUGALL, S.R., ANDERSON, A.R.A. & CHAPLAIN, M.A.J. (2006). Mathematical modeling of dynamic adaptive tumour-induced angiogenesis: clinical implications and therapeutic targeting strategies. *J Theor Biol*, **241**, 564–89.
- MEIJER, C., MULDER, N.H., TIMMER-BOSSCHA, H., SLUITER, W.J., MEERSMA, G.J. & DE VRIES, E.G. (1992). Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res*, **52**, 6885–9.
- MICCO, R.D., FUMAGALLI, M., CICALESE, A., PICCININ, S., GASPARINI, P., LUISE, C., SCHURRA, C., GARRE', M., NUCIFORO, P.G., BENSIMON, A., MAESTRO, R., PELICCI, P.G. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, **444**, 638–42.
- MICHALOGLOU, C., VREDEVELD, L.C.W., SOENGAS, M.S., DENOYELLE, C., KUILMAN, T., VAN DER HORST, C.M.A.M., MAJOOR, D.M., SHAY, J.W., MOOI, W.J. & PEEPER, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, **436**, 720–4.
- MIDDLETON, J., PATTERSON, A.M., GARDNER, L., SCHMUTZ, C. & ASHTON, B.A. (2002). Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*, **100**, 3853–60.
- MINCHENKO, A., BAUER, T., SALCEDA, S. & CARO, J. (1994). Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest*, **71**, 374–9.
- MINEUR, P., COLIGE, A.C., DEROANNE, C.F., DUBAIL, J., KESTELOOT, F., HABRAKEN, Y., NOËL, A., VÖÖ, S., WALTENBERGER, J., LAPIÈRE, C.M., NUSGENS, B.V. & LAMBERT, C.A. (2007). Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *J Cell Biol*, **179**, 1261–73.
- MOLLIKA, F., JAIN, R.K. & NETTI, P.A. (2003). A model for temporal heterogeneities of tumor blood flow. *Microvasc Res*, **65**, 56–60.

- MONZANI, E. & PORTA, C.A.L. (2008). Targeting cancer stem cells to modulate alternative vascularization mechanisms. *Stem Cell Rev*, **4**, 51–6.
- MORETTA, L., BIASSONI, R., BOTTINO, C., MINGARI, M.C. & MORETTA, A. (2002). Surface receptors that regulate the NK cell function: beyond the NK cell scope. *Curr Top Microbiol Immunol*, **266**, 11–22.
- MORIKAWA, S., BALUK, P., KAIDOH, T., HASKELL, A., JAIN, R.K. & McDONALD, D.M. (2002). Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol*, **160**, 985–1000.
- MULLER, Y.A., LI, B., CHRISTINGER, H.W., WELLS, J.A., CUNNINGHAM, B.C. & DE VOS, A.M. (1997). Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 7192–7.
- MURDOCH, C., MUTHANA, M., COFFELT, S.B. & LEWIS, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, **8**, 618–31.
- NAKASONE, E.S., ASKAUTRUD, H.A., KEES, T., PARK, J.H., PLAKS, V., EWALD, A.J., FEIN, M., RASCH, M.G., TAN, Y.X., QIU, J., PARK, J., SINHA, P., BISSELL, M.J., FRENGEN, E., WERB, Z. & EGEHLAD, M. (2012). Imaging tumor-stroma interactions during chemotherapy reveals contributions of the microenvironment to resistance. *Cancer Cell*, **21**, 488–503.
- NARANG, A.S. & VARIA, S. (2011). Role of tumor vascular architecture in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **63**, 640–58.
- NARDELLA, C., CLOHESSY, J.G., ALIMONTI, A. & PANDOLFI, P.P. (2011). Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer*, **11**, 503–11.
- NAUCK, M., KARAKIULAKIS, G., PERRUCHOUD, A.P., PAPAKONSTANTINO, E. & ROTH, M. (1998). Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, **341**, 309–15.
- NEUFELD, G., COHEN, T., GENGRINOVITCH, S. & POLTORAK, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, **13**, 9–22.
- NICKOLOFF, B.J., LINGEN, M.W., CHANG, B.D., SHEN, M., SWIFT, M., CURRY, J., BACON, P., BODNER, B. & RONINSON, I.B. (2004). Tumor suppressor maspin is up-regulated during keratinocyte senescence, exerting a paracrine antiangiogenic activity. *Cancer Res*, **64**, 2956–61.
- NOËL, A., JOST, M., LAMBERT, V., LECOMTE, J. & RAKIC, J.M. (2007). Anti-angiogenic therapy of exudative age-related macular degeneration: current progress and emerging concepts. *Trends Mol Med*, **13**, 345–52.
- NONAKA, Y., YOSHIDA, W., ABE, K., FERRI, S., SCHULZE, H., BACHMANN, T.T. & Ikebukuro, K. (2013). Affinity Improvement of a VEGF Aptamer by in Silico Maturation for a Sensitive VEGF-Detection System. *Anal Chem*, **85**, 1132–7.

- OGAWA, S., OKU, A., SAWANO, A., YAMAGUCHI, S., YAZAKI, Y. & SHIBUYA, M. (1998). A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem*, **273**, 31273–82.
- OHM, J.E., SHURIN, M.R., ESCHE, C., LOTZE, M.T., CARBONE, D.P. & GABRILOVICH, D.I. (1999). Effect of vascular endothelial growth factor and FLT3 ligand on dendritic cell generation in vivo. *J Immunol*, **163**, 3260–8.
- OHNO-MATSUI, K., YOSHIDA, T., UETAMA, T., MOCHIZUKI, M. & MORITA, I. (2003). Vascular endothelial growth factor upregulates pigment epithelium-derived factor expression via VEGFR-1 in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **303**, 962–7.
- OHTANI, N., YAMAKOSHI, K., TAKAHASHI, A. & HARA, E. (2004). The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest*, **51**, 146–53.
- OLIVE, K.P., JACOBETZ, M.A., DAVIDSON, C.J., GOPINATHAN, A., MCINTYRE, D., HONNESS, D., MADHU, B., GOLDGRABEN, M.A., CALDWELL, M.E., ALLARD, D., FRESE, K.K., DENICOLA, G., FEIG, C., COMBS, C., WINTER, S.P., IRELAND-ZECCHINI, H., REICHEL, S., HOWAT, W.J., CHANG, A., DHARA, M., WANG, L., RÜCKERT, F., GRÜTZMANN, R., PILARSKY, C., IZERADJENE, K., HINGORANI, S.R., HUANG, P., DAVIES, S.E., PLUNKETT, W., EGORIN, M., HRUBAN, R.H., WHITEBREAD, N., MCGOVERN, K., ADAMS, J., IACOBUZIO-DONAHUE, C., GRIFFITHS, J. & TUVESON, D.A. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*, **324**, 1457–61.
- PACHYNSKI, R.K., ZABEL, B.A., KOHRT, H.E., TEJEDA, N.M., MONNIER, J., SWANSON, C.D., HOLZER, A.K., GENTLES, A.J., SPERINDE, G.V., EDALATI, A., HADEIBA, H.A., ALIZADEH, A.A. & BUTCHER, E.C. (2012). The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses. *Journal of Experimental Medicine*, **209**, 1427–1435.
- PACKER, L. & FUEHR, K. (1977). Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature*, **267**, 423–5.
- PÀEZ-RIBES, M., ALLEN, E., HUDOCK, J., TAKEDA, T., OKUYAMA, H., VIÑALS, F., INOUE, M., BERGERS, G., HANAHAN, D. & CASANOVAS, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*, **15**, 220–31.
- PAJALUNGA, D., MAZZOLA, A., SALZANO, A.M., BIFERI, M.G., LUCA, G.D. & CRESCENZI, M. (2007). Critical requirement for cell cycle inhibitors in sustaining nonproliferative states. *J Cell Biol*, **176**, 807–18.

- PAJUSOLA, K., APRELIKOVA, O., KORHONEN, J., KAIPAINEN, A., PERTOVAARA, L., ALITALO, R. & ALITALO, K. (1992). FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res*, **52**, 5738–43.
- PALMER, R.M., FERRIGE, A.G. & MONCADA, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524–6.
- PARDOLL, D.M. & TOPALIAN, S.L. (1998). The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol*, **10**, 588–94.
- PARK, J.I., JEONG, J.S., HAN, J.Y., KIM, D.I., GAO, Y.H., PARK, S.C., RODGERS, G.P. & KIM, I.H. (2000). Hydroxyurea induces a senescence-like change of K562 human erythroleukemia cell. *J Cancer Res Clin Oncol*, **126**, 455–60.
- PARRINELLO, S., SAMPER, E., KRTOLICA, A., GOLDSTEIN, J., MELOV, S. & CAMPISI, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol*, **5**, 741–7.
- PATAN, S. (2000). Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol*, **50**, 1–15.
- PATAN, S., ALVAREZ, M.J., SCHITTONY, J.C. & BURRI, P.H. (1992). Intussusceptive microvascular growth: a common alternative to capillary sprouting. *Arch Histol Cytol*, **55 Suppl**, 65–75.
- PEREGO, P., GIAROLA, M., RIGHETTI, S.C., SUPINO, R., CASERINI, C., DELIA, D., PIEROTTI, M.A., MIYASHITA, T., REED, J.C. & ZUNINO, F. (1996). Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res*, **56**, 556–62.
- PERTOVAARA, L., KAIPAINEN, A., MUSTONEN, T., ORPANA, A., FERRARA, N., SAKSELA, O. & ALITALO, K. (1994). Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*, **269**, 6271–4.
- PEYSSONNAUX, C., DATTA, V., CRAMER, T., DOEDENS, A., THEODORAKIS, E.A., GALLO, R.L., HURTADO-ZIOLA, N., NIZET, V. & JOHNSON, R.S. (2005). HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest*, **115**, 1806–15.
- PILCH, H., SCHLENGER, K., STEINER, E., BROCKERHOFF, P., KNAPSTEIN, P. & VAUPEL, P. (2001). Hypoxia-stimulated expression of angiogenic growth factors in cervical cancer cells and cervical cancer-derived fibroblasts. *Int J Gynecol Cancer*, **11**, 137–42.
- PLATE, K.H., BREIER, G. & RISAU, W. (1994). Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol*, **4**, 207–18.



- PLENDL, J. (2000). Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anat Histol Embryol*, **29**, 257–66.
- POLTORAK, Z., COHEN, T., SIVAN, R., KANDELIS, Y., SPIRA, G., VLODAVSKY, I., KESHET, E. & NEUFELD, G. (1997). VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem*, **272**, 7151–8.
- RAKHRA, K., BACHIREDDY, P., ZABUAWALA, T., ZEISER, R., XU, L., KOPELMAN, A., FAN, A.C., YANG, Q., BRAUNSTEIN, L., CROSBY, E., RYEOM, S. & FELSHER, D.W. (2010). CD4(+) T cells contribute to the remodeling of the microenvironment required for sustained tumor regression upon oncogene inactivation. *Cancer Cell*, **18**, 485–98.
- RANSON, T., VOSSHENRICH, C.A.J., CORCUFF, E., RICHARD, O., MÜLLER, W. & SANTO, J.P.D. (2003). IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood*, **101**, 4887–93.
- RAULET, D.H. & VANCE, R.E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*, **6**, 520–31.
- RAVIZZA, R., GARIBOLDI, M.B., PASSARELLI, L. & MONTI, E. (2004). Role of the p53/p21 system in the response of human colon carcinoma cells to Doxorubicin. *BMC Cancer*, **4**, 92.
- RISAU, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671–4.
- RISAU, W. & FLAMME, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **11**, 73–91.
- RODIER, F. (2013). Detection of the Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). *Methods Mol Biol*, **965**, 165–73.
- RODIER, F. & CAMPISI, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, **192**, 547–556.
- ROSS, R. (1995). Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*, **57**, 791–804.
- RUPNICK, M.A., PANIGRAHY, D., ZHANG, C.Y., DALLABRIDA, S.M., LOWELL, B.B., LANGER, R. & FOLKMAN, M.J. (2002). Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 10730–5.
- SAGE, J., MILLER, A.L., PÉREZ-MANCERA, P.A., WYSOCKI, J.M. & JACKS, T. (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature*, **424**, 223–8.
- SAGER, R. (1991). Senescence as a mode of tumor suppression. *Environ Health Perspect*, **93**, 59–62.
- SAGIV, A., BIRAN, A., YON, M., SIMON, J., LOWE, S.W. & KRIZHANOVSKY, V. (2012). Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells. *Oncogene*.

- SAMBROOK, J. (1989). Molecular Cloning; a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*.
- SASABE, E., ZHOU, X., LI, D., OKU, N., YAMAMOTO, T. & OSAKI, T. (2007). The involvement of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the susceptibility to gamma-rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer*, **120**, 268–77.
- SCHMID, M.C. & VARNER, J.A. (2007). Myeloid cell trafficking and tumor angiogenesis. *Cancer Lett*, **250**, 1–8.
- SCHMITT, C.A. (2003). Senescence, apoptosis and therapy—cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 286–95.
- SCHMITT, C.A., FRIDMAN, J.S., YANG, M., LEE, S., BARANOV, E., HOFFMAN, R.M. & LOWE, S.W. (2002). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*, **109**, 335–46.
- SEMENZA, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **3**, 721–32.
- SENGER, D.R., GALLI, S.J., DVORAK, A.M., PERRUZZI, C.A., HARVEY, V.S. & DVORAK, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, **219**, 983–5.
- SERRANO, M., LIN, A.W., MCCURRACH, M.E., BEACH, D. & LOWE, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. *Cell*, **88**, 593–602.
- SHAHEEN, R.M., DAVIS, D.W., LIU, W., ZEBROWSKI, B.K., WILSON, M.R., BUCANA, C.D., MCCONKEY, D.J., MCMAHON, G. & ELLIS, L.M. (1999). Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res*, **59**, 5412–6.
- SHAW, P.H. (1996). The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol Res Pract*, **192**, 669–75.
- SHAY, J.W. & RONINSON, I.B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*, **23**, 2919–33.
- SHEN, H., CLAUSS, M., RYAN, J., SCHMIDT, A.M., TIJBURG, P., BORDEN, L., CONNOLLY, D., STERN, D. & KAO, J. (1993). Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood*, **81**, 2767–73.
- SHERR, C.J. & ROBERTS, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501–12.
- SHERWOOD, S.W., RUSH, D., ELLSWORTH, J.L. & SCHIMKE, R.T. (1988). Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 9086–90.

- SHIBUYA, M., YAMAGUCHI, S., YAMANE, A., IKEDA, T., TOJO, A., MATSUSHIME, H. & SATO, M. (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, **5**, 519–24.
- SHOJAEI, F., WU, X., MALIK, A.K., ZHONG, C., BALDWIN, M.E., SCHANZ, S., FUH, G., GERBER, H.P. & FERRARA, N. (2007). Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat Biotechnol*, **25**, 911–20.
- SHWEIKI, D., ITIN, A., SOFFER, D. & KESHET, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, **359**, 843–5.
- SHWEIKI, D., NEEMAN, M., ITIN, A. & KESHET, E. (1995). Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 768–72.
- SIEMEISTER, G., MARMÉ, D. & MARTINY-BARON, G. (1998). The alpha-helical domain near the amino terminus is essential for dimerization of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, **273**, 11115–20.
- SIEMENS, D.R., HU, N., SHEIKHI, A.K., CHUNG, E., FREDERIKSEN, L.J., PROSS, H. & GRAHAM, C.H. (2008). Hypoxia Increases Tumor Cell Shedding of MHC Class I Chain-Related Molecule: Role of Nitric Oxide. *Cancer Res*, **68**, 4746–4753.
- SIMIONESCU, M. (2007). Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 266–74.
- SMITH, S.K. (1998). Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum Reprod Update*, **4**, 509–19.
- SMYTH, M.J., THIA, K.Y., CRETNEY, E., KELLY, J.M., SNOOK, M.B., FORBES, C.A. & SCALZO, A.A. (1999). Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J Immunol*, **162**, 6658–62.
- SMYTH, M.J., HAYAKAWA, Y., TAKEDA, K. & YAGITA, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**, 850–61.
- SMYTH, M.J., SWANN, J., CRETNEY, E., ZERAFA, N., YOKOYAMA, W.M. & HAYAKAWA, Y. (2005). NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med*, **202**, 583–8.
- SONG, S., WIENTJES, M.G., WALSH, C. & AU, J.L. (2001). Nontoxic doses of suramin enhance activity of paclitaxel against lung metastases. *Cancer Res*, **61**, 6145–50.
- SOUSSI, T. & BÉROUD, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, **1**, 233–40.
- SPARMANN, A. & BAR-SAGI, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*, **6**, 447–58.

- STALMANS, I., NG, Y.S., ROHAN, R., FRUTTIGER, M., BOUCHÉ, A., YUCE, A., FUJISAWA, H., HERMANS, B., SHANI, M., JANSEN, S., HICKLIN, D., ANDERSON, D.J., GARDINER, T., HAMMES, H.P., MOONS, L., DEWERCHIN, M., COLLEN, D., CARMELIET, P. & D'AMORE, P.A. (2002). Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest*, **109**, 327–36.
- STEIN, G.H., DRULLINGER, L.F., SOULARD, A. & DULIĆ, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **19**, 2109–17.
- STEIN, I., NEEMAN, M., SHWEIKI, D., ITIN, A. & KESHET, E. (1995). Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol*, **15**, 5363–8.
- STOCKMANN, C., DOEDENS, A., WEIDEMANN, A., ZHANG, N., TAKEDA, N., GREENBERG, J.I., CHERESH, D.A. & JOHNSON, R.S. (2008). Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature*, **456**, 814–8.
- STOLER, D.L., ANDERSON, G.R., RUSSO, C.A., SPINA, A.M. & BEERMAN, T.A. (1992). Anoxia-inducible endonuclease activity as a potential basis of the genomic instability of cancer cells. *Cancer Res*, **52**, 4372–8.
- SUAREZ, S.C., PIEREN, M., CARIOLATO, L., ARN, S., HOFFMANN, U., BOGUCKI, A., MANLIUS, C., WOOD, J. & BALLMER-HOFER, K. (2006). A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 2067–77.
- SUGRUE, M.M., SHIN, D.Y., LEE, S.W. & AARONSON, S.A. (1997). Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 9648–53.
- SUN, J., ZHANG, Y., YANG, M., ZHANG, Y., XIE, Q., LI, Z., DONG, Z., YANG, Y., DENG, B., FENG, A., HU, W., MAO, H. & QU, X. (2010). Hypoxia induces T-cell apoptosis by inhibiting chemokine C receptor 7 expression: the role of adenosine receptor A(2). *Cell Mol Immunol*, **7**, 77–82.
- SUND, M., ZEISBERG, M. & KALLURI, R. (2005). Endogenous stimulators and inhibitors of angiogenesis in gastrointestinal cancers: basic science to clinical application. *Gastroenterology*, **129**, 2076–91.
- TAKAHASHI, T., SHIRASAWA, T., MIYAKE, K., YAHAGI, Y., MARUYAMA, N., KASAHARA, N., KAWAMURA, T., MATSUMURA, O., MITARAI, T. & SAKAI, O. (1995). Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **209**, 218–26.

- TAKEDA, K., TSUTSUI, H., YOSHIMOTO, T., ADACHI, O., YOSHIDA, N., KISHIMOTO, T., OKAMURA, H., NAKANISHI, K. & AKIRA, S. (1998). Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity*, **8**, 383–90.
- TAKEDA, K., HAYAKAWA, Y., SMYTH, M.J., KAYAGAKI, N., YAMAGUCHI, N., KAKUTA, S., IWAKURA, Y., YAGITA, H. & OKUMURA, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med*, **7**, 94–100.
- TALKS, K.L. & HARRIS, A.L. (2000). Current status of antiangiogenic factors. *Br J Haematol*, **109**, 477–89.
- TALMADGE, J.E., MEYERS, K.M., PRIEUR, D.J. & STARKEY, J.R. (1980). Role of natural killer cells in tumor growth and metastasis: C57BL/6 normal and beige mice. *J Natl Cancer Inst*, **65**, 929–35.
- TAMURA, M., OHTA, Y., KAJITA, T., KIMURA, K., GO, T., ODA, M., NAKAMURA, H. & WATANABE, G. (2001). Plasma VEGF concentration can predict the tumor angiogenic capacity in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, **8**, 1097–102.
- TE POELE, R.H., OKOROKOV, A.L., JARDINE, L., CUMMINGS, J. & JOEL, S.P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **62**, 1876–83.
- TONNESEN, M.G., FENG, X. & CLARK, R.A. (2000). Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc*, **5**, 40–6.
- TORRY, D.S. & TORRY, R.J. (1997). Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta. *Am J Reprod Immunol*, **37**, 21–9.
- TOWBIN, H., STAEGELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 4350–4.
- UTHOFF, S.M.S., DUCHROW, M., SCHMIDT, M.H.H., BROLL, R., BRUCH, H.P., STRIK, M.W. & GALANDIUK, S. (2002). VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer. *Int J Cancer*, **101**, 32–6.
- VAJKOCZY, P., MENDER, M.D., VOLLMAR, B., SCHILLING, L., SCHMIEDEK, P., HIRTH, K.P., ULLRICH, A. & FONG, T.A. (1999). Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy. *Neoplasia*, **1**, 31–41.
- VAN DER VELDT, A., LUBBERINK, M., BAHCE, I., WALRAVEN, M., DE BOER, M.P., GREUTER, H.N.J.M., HENDRIKSE, N.H., ERIKSSON, J., WINDHORST, A.D., POSTMUS, P.E.,

- VERHEUL, H.M., SERNÉ, E.H., LAMMERTSMA, A.A. & SMIT, E.F. (2012). Rapid decrease in delivery of chemotherapy to tumors after anti-VEGF therapy: implications for scheduling of anti-angiogenic drugs. *Cancer Cell*, **21**, 82–91.
- VARTANIAN, R.K. & WEIDNER, N. (1994). Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol*, **144**, 1188–94.
- VESELY, M.D., KERSHAW, M.H., SCHREIBER, R.D. & SMYTH, M.J. (2011). Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu. Rev. Immunol.*, **29**, 235–271.
- VITTET, D., CIAIS, D., KERAMIDAS, M., FRAIPONT, F.D. & FEIGE, J.J. (2000). Paracrine control of the adult adrenal cortex vasculature by vascular endothelial growth factor. *Endocr Res*, **26**, 843–52.
- VON ZGLINICKI, T., SARETZKI, G., DÖCKE, W. & LOTZE, C. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res*, **220**, 186–93.
- WAJAPPEYEE, N., SERRA, R.W., ZHU, X., MAHALINGAM, M. & GREEN, M.R. (2008). Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell*, **132**, 363–74.
- WALMSLEY, S.R., PRINT, C., FARAH, N., PEYSSONNAUX, C., JOHNSON, R.S., CRAMER, T., SOBOLEWSKI, A., CONDLIFFE, A.M., COWBURN, A.S., JOHNSON, N. & CHILVERS, E.R. (2005). Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 $\alpha$ -dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med*, **201**, 105–15.
- WALTENBERGER, J., CLAEISSON-WELSH, L., SIEGBAHN, A., SHIBUYA, M. & HELDIN, C.H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, **269**, 26988–95.
- WANG, X., WONG, S.C., PAN, J., TSAO, S.W., FUNG, K.H., KWONG, D.L., SHAM, J.S. & NICHOLLS, J.M. (1998). Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res*, **58**, 5019–22.
- WANG, X., LIU, Y., CHOW, L.S., WONG, S.C., TSAO, S.W., KWONG, D.L., WANG, J., SHAM, J.S. & NICHOLLS, J.M. (1999). Cisplatin-induced p53-independent growth arrest and cell death in cancer cells. *Int J Oncol*, **15**, 1097–102.
- WARREN, R.S., YUAN, H., MATLI, M.R., FERRARA, N. & DONNER, D.B. (1996). Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem*, **271**, 29483–8.

- WATFORD, W.T., MORIGUCHI, M., MORINOBU, A. & O'SHEA, J.J. (2003). The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev*, **14**, 361–8.
- WELFORD, S.M., BEDOGNI, B., GRADIN, K., POELLINGER, L., POWELL, M.B. & GIACCIA, A.J. (2006). HIF1alpha delays premature senescence through the activation of MIF. *Genes Dev*, **20**, 3366–71.
- WEY, J.S., FAN, F., GRAY, M.J., BAUER, T.W., MCCARTY, M.F., SOMCIO, R., LIU, W., EVANS, D.B., WU, Y., HICKLIN, D.J. & ELLIS, L.M. (2005). Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer*, **104**, 427–38.
- WHITESIDE, T.L. (2006). The role of immune cells in the tumor microenvironment. *Cancer Treat Res*, **130**, 103–24.
- WHITTLE, C., GILLESPIE, K., HARRISON, R., MATHIESON, P.W. & HARPER, S.J. (1999). Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant. *Clin Sci*, **97**, 303–12.
- WILSON, T.R., LONGLEY, D.B. & JOHNSTON, P.G. (2006). Chemoresistance in solid tumours. *Ann Oncol*, **17 Suppl 10**, x315–24.
- WOOLARD, J., BEVAN, H.S., HARPER, S.J. & BATES, D.O. (2009). Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. *Microcirculation*, **16**, 572–92.
- XUE, W., ZENDER, L., MIETHING, C., DICKINS, R.A., HERNANDO, E., KRIZHANOVSKY, V., CORDON-CARDO, C. & LOWE, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, **445**, 656–660.
- YAMAZAKI, Y., TAKANI, K., ATODA, H. & MORITA, T. (2003). Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J Biol Chem*, **278**, 51985–8.
- YLÄ-HERTTUALA, S., RISSANEN, T.T., VAJANTO, I. & HARTIKAINEN, J. (2007). Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*, **49**, 1015–26.
- YOKOTA, M., FUKUI, A., FUNAMIZU, A., NAKAMURA, R., KAMOI, M., FUCHINOUE, K., SASAKI, Y., FUKUHARA, R. & MIZUNUMA, H. (2013). Role of NKp46 Expression in Cytokine Production by CD56-Positive NK Cells in the Peripheral Blood and the Uterine Endometrium. *Am J Reprod Immunol*.

- YOUNG, A.P., SCHLISIO, S., MINAMISHIMA, Y.A., ZHANG, Q., LI, L., GRISANZIO, C., SIGNORETTI, S. & KAE LIN, W.G. (2008). VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat Cell Biol*, **10**, 361–9.
- YOUNG, A.R.J. & NARITA, M. (2009). SASP reflects senescence. *EMBO Rep*, **10**, 228–30.
- ZACHARY, I. (1998). Vascular endothelial growth factor: how it transmits its signal. *Exp Nephrol*, **6**, 480–7.
- ZHANG, H. (2007). Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol*, **210**, 567–74.
- ZHAO, W., LIN, Z.X. & ZHANG, Z.Q. (2004). Cisplatin-induced premature senescence with concomitant reduction of gap junctions in human fibroblasts. *Cell Res*, **14**, 60–6.
- ZITVOGEL, L., APETOH, L., GHIRINGHELLI, F. & KROEMER, G. (2008a). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*, **8**, 59–73.
- ZITVOGEL, L., TESNIERE, A., APETOH, L., GHIRINGHELLI, F. & KROEMER, G. (2008b). Immunological aspects of anticancer chemotherapy. *Bull Acad Natl Med*, **192**, 1469–87; discussion 1487–9.



## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb. ....	Abbildung
ACK ....	Ammonium-Chloride-Potassium
CD ....	Cluster of differentiation
CDK(N) ....	Cyclin-dependent kinase (inhibitor)
CLRB ....	C-type lectin-related protein B
CSF ....	Macrophage colony-stimulating factor
CT ....	Cycle threshold
CXCL ....	Chemokine CXC motif ligand
DDR ....	DNA damage response
DNA ....	Deoxyribonucleic acid
DNA ....	Desoxyribonukleinsäure
DT ....	Doubling time
ECM ....	Extracellular Matrix
EGF ....	Epidermal growth factor
ELISA ....	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS ....	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fas ....	Fas ligand
FGF ....	Fibroblast growth factor
G1/G2 ....	Wachstumsphase G1/G2
HIF ....	Hypoxia-inducible Factor
HRP ....	Horseradish peroxidase
i.p. ....	intraperitoneal
IFN ....	Interferon
IGF ....	Insulin-like growth factor
IGFBP ....	Insulin-like growth factor binding protein
IgG ....	Immunglobulin G
IL ....	Interleukin
kDA ....	Kilodalton
KO ....	Knockout
LLC ....	Lewis Lung Carcinoma
LysM ....	Lysozym M
MCP ....	Monocyte chemoattractant protein
MHC ....	Major histocompatibility complex
MMP ....	Matrixmetalloproteinase

---

mRNA	.....	messenger RNA
MULT	.....	Murine UL16-binding proteinlike transcript
n	.....	Anzahl
NK-Zellen	.....	Natürliche Killerzellen
NKG2D	.....	Natural killer group 2, member D
p53	.....	Tumorsuppressor-Protein p53
PBS(-T)	.....	Phosphate buffered saline (+ Tween)
PCR	.....	Polymerase chain reaction
PDGF(-R)	.....	Plateled derived growth factor (-receptor)
PHD	.....	Prolinhydroxylase
PIMO	.....	Pimonidazol
PIGF	.....	Placenta growth factor
px	.....	Pixel
qPCR	.....	quantitative realtime PCR
RAET	.....	Retinoic acid early transcript
RIPA	.....	Radio-Immune precipitation assay
RNA	.....	Ribonucleic acid
ROS	.....	Reactive oxygen species
RT(-PCR)	.....	Reverse Transkriptase (-PCR)
SA(SP)	.....	Senescence-associated (secretory phenotype)
SA- $\beta$ -Gal	.....	Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galaktosidase
SDS-PAGE	.....	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	.....	Standard error of mean
SMA	.....	Smooth muscle actin
TAA	.....	Tumorassoziiertes Antigen
Tab.	.....	Tabelle
TAE	.....	Tris-acetate-EDTA
TBS(-T)	.....	Tris-buffered saline (+ Tween)
TGF	.....	Transforming growth factor
TNF	.....	Tumor necrosis factor
TRAIL	.....	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TSP	.....	Thrombospondin
VCAM	.....	Vascular cell adhesion molecule
VEGF(-R)	.....	Vascular endothelial growth factor (-receptor)
VPF	.....	Vascular permeability factor
vWF	.....	von-Willebrand-Faktor
WT	.....	Wildtyp
X-Gal	.....	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactopyranosid

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktureller Aufbau der Blutgefäße . . . . .	1
1.2	Mechanismen der Blutgefäßentstehung . . . . .	3
1.3	Struktur physiologischer und tumoraler Blutgefäße . . . . .	5
1.4	Mechanismen der Blutgefäßentstehung im Tumor . . . . .	7
1.5	VEGF-Struktur . . . . .	8
1.6	Schematische Repräsentation der beschriebenen humanen (A) und murinen (B) VEGF-Isoformen . . . . .	9
1.7	VEGF-Signaltransduktionswege . . . . .	10
1.8	Regulierung der VEGF-Expression durch den Hypoxie-induzierbaren Fak- tor HIF-1 . . . . .	11
1.9	Antioangiogene Therapieansätze . . . . .	13
1.10	NK-Zellen und ihre Aktivierung über inhibierende bzw. aktivierende Re- zeptoren . . . . .	17
1.11	Wirkstoff-Resistenzmechanismen in soliden Tumoren nach Wilson <i>et al.</i> (2006) . . . . .	19
4.1	Behandlungsschema für implantierte Tumor-Isografts in WT- und KO- Mäusen. . . . .	39
4.2	Wachstumskinetiken chemotherapeutisch behandelter Tumore in WT- und KO-Mäusen. . . . .	40
4.3	KO-Tumore proliferieren langsamer nach chemotherapeutischer Behand- lung mit Cisplatin . . . . .	41
4.4	Verlust von myeloid Zell-spezifischem VEGF bewirkt eine Veränderung des vaskulären Phänotyps . . . . .	43
4.5	Inaktivierung von VEGF in myeloischen Zellen hat Einfluss auf intratumo- rale VEGF-Proteinlevel . . . . .	44
4.6	Chemotherapeutische Behandlung reduziert Tumorphypoxie in WT- und KO-Tumoren . . . . .	45
4.7	Chemotherapie induziert stärkere Apoptose-Antwort in KO-Tumoren . . .	48
4.8	Chemotherapeutische Behandlung induziert verstärkte p53- und p21-Ex- pression in KO-Tumoren . . . . .	49
4.9	Zytotoxische Behandlung induziert verstärkte Seneszenz in KO-Tumoren .	50
4.10	Differentielle Expression SASP-assoziiierter Gene in WT- und KO-Tumoren nach Chemotherapie . . . . .	51
4.11	Genexpressionsanalysen weiterer SASP-Marker zeigen keine signifikante Änderung der Transkriptlevel in WT- und KO-Tumoren nach Chemotherapie	51
4.12	Immunzellen des angeborenen Immunsystems infiltrieren LLC-Tumore nach Chemotherapie . . . . .	53

4.13	Zellen des adaptiven Immunsystems spielen eine untergeordnete Rolle in der Immunantwort nach Chemotherapie in WT- und KO-Tumoren . . . . .	54
4.14	Immunzellspezifische Interleukine und Zytokine korrelieren mit erhöhter Immunzellantwort im KO-Tumor nach ytotoxischer Behandlung . . . . .	55
4.15	Reduktion intratumoraler NK-Zellen nach Depletion mit monoklonalem Antikörper PK136 . . . . .	56
4.16	NK-Depletion beeinflusst nicht die Infiltration von Makrophagen und dendritischen Zellen . . . . .	57
4.17	LLC-Tumore aus WT- und KO-Mäusen zeigen keine Größenunterschiede nach NK-Zell-Inhibierung . . . . .	57
4.18	Depletion von NK-Zellen bewirkt Reduktion von <i>IFN-<math>\gamma</math></i> in LLC-Tumoren .	58
4.19	Die Elimination seneszenten Zellen in LLC-Tumore ist abhängig von NK-Zellen . . . . .	58
4.20	Mausmodell zur Untersuchung Tumorzell-intrinsischer Einflüsse auf die Tumorrückbildung nach Chemotherapie. . . . .	60
4.21	Explantierte Tumore aus KO-Mäusen weisen ein höheres Seneszenzvorkommen unter <i>ex vivo</i> -Konditionen auf . . . . .	61
4.22	Proliferationsrate von explantierten WT- und KO-Tumoren nach Chemotherapie . . . . .	61
4.23	Die verstärkte Expression von SASP-Markern bleibt in explantierten KO-Tumoren erhalten . . . . .	62
4.24	Immunzellen des nicht-adaptiven Immunsystems infiltrieren stärker in KO > C57Bl6/J-Tumore . . . . .	63
4.25	WT > C57Bl6/J- und KO > C57Bl6/J-Tumore zeigen eine geringe Infiltration von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen . . . . .	64
4.26	Immunzellspezifische Interleukine und Zytokine korrelieren mit erhöhter Immunzellantwort in KO > C57Bl6/J-Tumoren . . . . .	64
4.27	KO-Tumore zeigen verringerte Expression von SA- $\beta$ -Galaktosidase nach Reinjektion in naive C57Bl6/J-Mäuse . . . . .	65
4.28	Reinjizierte WT-Tumore weisen ein schnelleres Wachstum in WT-Rezipienten auf . . . . .	66
4.29	Die Vaskularisierung beeinflusst nicht das Wachstum reinjizierter WT- und KO-Tumore . . . . .	66
4.30	Tumore aus WT > C57Bl6/J- und KO > C57Bl6/J-Mäusen zeigen keine Unterschiede bezüglich Tumorphoxie . . . . .	67
5.1	Hypothetischer Mechanismus für eine verzögerte Tumorrückbildung chemotherapeutischer behandelter Tumore in Mäusen mit einer genetischen Inaktivierung für VEGF in myeloischen Zellen . . . . .	80

### 8.3 Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht wichtiger pro- und antiangiogener Faktoren . . . . .	7
3.1	Verwendete Geräte mit Herstellerbezeichnung . . . . .	21
3.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	22
3.3	Verwendete Chemikalien . . . . .	22
3.4	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper . . . . .	26
3.5	Verwendete Primer zur Amplifikation der entsprechenden Gensequenz . . .	27
3.6	Übersicht und Anwendungszweck verwendeter kommerzieller Kits . . . . .	28
3.7	Einzelansatz für den RT-Mix zur cDNA-Synthese . . . . .	29
3.8	Typischer PCR-Ansatz zur Amplifikation von DNA . . . . .	30
3.9	Exemplarisches PCR-Programm für die Amplifikation von DNA . . . . .	30
3.10	Reaktionsansatz zur Doppelbestimmung der Genexpression mittels quantitativer Realtime-PCR . . . . .	32
3.11	Exemplarisches Realtime-PCR-Programm zur Quantifizierung der Genexpression . . . . .	32
3.12	Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele für die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE . . . . .	33
3.13	Einzelansatz für die PCR zur Genotypisierung . . . . .	37

## 8.5 Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Der Effekt von VEGF aus myeloischen Zellen auf die Entstehung von Tumorrezidiven nach chemotherapeutischer Behandlung“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Ralph Sebastian Klose befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

Name/Unterschrift des wissenschaft. Betreuers

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Name/Unterschrift des Doktoranden

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den \_\_\_\_\_

Name/Unterschrift des Doktoranden

## 8.6 Danksagung

Zahlreiche Leute haben zu der Entstehung dieser vorliegenden Arbeit beigetragen. Mein besonderer Dank geht dabei an:

...Herrn Prof. Christian Stockmann - für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die zahlreichen hilfreichen Anregungen sowie seine erwiesene Geduld bis zur Abgabe dieser Arbeit

...Herrn Prof. Joachim Fandrey - als kompetenter Ansprechpartner für Probleme jeglicher Art sowie für seine maßgebliche Beteiligung an der Entstehung der AG Stockmann

...Frau Prof. Wiebke Hansen - für ihre Bereitschaft zur Übernahme eines Gutachtens

...Frau Prof. Veronika Sexl, Frau Dr. Iris Helfrich, Dagmar Gotthardt und Eva Putz - für den regen wissenschaftlichen Austausch und ihre tatkräftige Unterstützung meines Projekts

...alle Mitarbeiter des Instituts für Physiologie - insbesondere Katrin, für ihre erstklassige Unterstützung im Labor, Ulf, für interessante (nicht-) wissenschaftliche Konversationen sowie Anna-Katharina, die sich neben ihrer Zuverlässigkeit im Labor besonders durch ihre Fähigkeit als berufliche und private Reisepartnerin auszeichnete.

...Laura, Aline, Isa, Giannina, Philipp, Tim, Stefan, Frank, Marc, Sven und David - für die Aufrechterhaltung der vielzitierten „Work-Life-Balance“

...Holger, Ina und Nele - für die erlebnisreichen Wochenenden im schönen Hamburg

...Mama und Papa - für die finanzielle Unterstützung und Motivation während meines Studiums, das diese Arbeit erst ermöglicht hat

...Noli - die mir durch ihre liebevolle Art und Weise immer wieder gezeigt hat, dass man den Arbeitsalltag auch mal vergessen kann.